ISSN 2186-7976

March 5, 2017
平成２９年３月５日発行

# Annual Meeting of the Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, 2017

# 大会講演要旨集

## ■２０１７年度(平成２９年度)大会[京都]■



公益社団法人日本農芸化学会

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

© Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry

# 目次

授賞式、受賞者講演、受賞者----------3
一般講演番号の見方----------7
一般講演プログラム----------8
一般講演要旨----------80
大会シンポジウムプログラム----------1,986
大会シンポジウム要旨----------1,993
実行委員会企画シンポジウムプログラム----------2,069
実行委員会企画シンポジウム要旨----------2,070
ランチョンシンポジウムプログラム----------2,082
ランチョンシンポジウム要旨----------2,083
ランチョンセミナープログラム----------2,086
ランチョンセミナー広告要旨----------2,088

# 日本農芸化学会
# (2017年度)学会賞等授賞式，受賞者講演，受賞者一覧

日　時：2017年3月17日(金) 9:00～14:00（受付 8:30～）
会　場：ウェスティン都ホテル京都(京都市東山区栗田口華頂町1)
次　第：

(9:00) **2017年度学会賞等授賞式**　　東館2階「山城の間」
　1　授賞選考委員長報告
　2　日本農芸化学会賞授与
　3　日本農芸化学会功績賞授与
　4　農芸化学技術賞授与
　5　農芸化学奨励賞授与
(9:20) **農芸化学女性研究者賞等授賞式**
　1　農芸化学女性研究者賞等授賞選考委員長報告
　2　農芸化学女性研究者賞授与
　3　農芸化学若手女性研究者賞授与
　4　農芸化学女性企業研究者賞授与
(9:30) **第14回農芸化学研究企画賞表彰式**
　1　産学官学術交流委員長報告
　2　農芸化学研究企画賞表彰
(9:35) **BBB論文賞，BBB Most-Cited Review Award表彰式**
　1　英文誌編集委員長報告
(9:40) **会長祝辞**
(9:45) ＊＊＊＊＊＊　休憩15分間　＊＊＊＊＊＊
(10:00) **受賞者講演開始**
(10:00) 日本農芸化学会賞受賞者講演(2件，各30分)
(11:00) 日本農芸化学会功績賞受賞者講演(2件，各30分)
(12:00) ＊＊＊＊＊＊　休憩60分間　＊＊＊＊＊＊
(13:00) 農芸化学技術賞受賞者講演(4件，各15分)
(14:00) **終了予定**
(18:30～20:30) **懇親会**　西館4階「瑞穂の間」
※奨励賞受賞講演は，18日，19日に行われる一般講演枠で行います．開催時間・会場は下記受賞者欄をご確認下さい．

**農芸化学女性研究者賞等受賞者講演**
日　時：2017年3月18日(土) 15:00～17:35
会　場：京都女子大学C10会場(C校舎2階203)
次　第：
(15:00) 開会の辞
　会長挨拶
(15:05) 農芸化学女性研究者賞受賞講演(3件，各15分)
(15:50) 農芸化学若手女性研究者賞受賞講演(3件，各15分)
(16:35) ＊＊＊＊＊＊　休憩10分間　＊＊＊＊＊＊
(16:45) 農芸化学女性企業研究者賞受賞講演(3件，各15分)
(17:30) 閉会の辞

受賞者：

**【日本農芸化学会賞】**（2 件，50 音順）

浅見　忠男　（東京大学大学院農学生命科学研究科）
「植物ホルモン機能の化学的制御とその応用に関する研究」

内海龍太郎　（近畿大学農学部）
「細菌情報伝達ネットワークの分子機構と情報伝達阻害型薬剤の開発」

**【日本農芸化学会功績賞】**（2 件，50 音順）

木村　　誠　（九州大学大学院農学研究院）
「核酸結合タンパク質の構造機能相関と機能開発」

吉川　博文　（東京農業大学応用生物科学部）
「微生物ゲノムの解読と機能解析」

**【農芸化学技術賞】**（4 件，50 音順）

味の素株式会社　（賛助会員）
「新規酵素による汎用的ペプチド新製法の開発とアスパルテームの工業生産」

塩野　貴史・河合淳一郎・山本研一朗・四元　祐子　（キリン株式会社・キリンビバレッジ株式会社）
「天然吸着剤による茶飲料からのカフェイン除去技術の開発」

サントリーホールディングス株式会社　（賛助会員）
「ケルセチン配糖体配合飲料　特定保健用食品「伊右衛門　特茶」の開発」

日本食品化工株式会社　（賛助会員）
「活性炭触媒を利用した脱水縮合技術の開発とそれを用いた難消化性グルカンの生産」

**【農芸化学奨励賞受賞】**（10 件，50 音順）

安藤　晃規　（京都大学大学院農学研究科）《受賞講演：3 月 19 日　14:00～14:15　C24 会場》
「油糧糸状菌の分子育種基盤の構築と有用油脂生産への展開」

岡　　拓二　（崇城大学生物生命学部）《受賞講演：3 月 18 日　14:00～14:15　C24 会場》
「糸状菌と植物の糖鎖生合成に関与する諸酵素に関する研究」

甲斐　建次　（大阪府立大学大学院生命環境科学研究科）《受賞講演：3 月 18 日　14:00～14:15　C12 会場》
「グラム陰性細菌の寄生・共生現象を制御するクオラムセンシング機構に関する生物有機化学的研究」

肥塚　崇男　（山口大学大学院創成科学研究科）《受賞講演：3 月 19 日　14:00～14:15　J32 会場》
「植物香気成分の生合成酵素の機能進化と反応制御機構に関する研究」

竹下　典男　（筑波大学生命環境系）《受賞講演：3 月 19 日　11:45～12:00　C24 会場》
「糸状菌の先端生長における極性制御機構の解析」

崔　　宰熏　（静岡大学学術院農学領域）《受賞講演：3 月 19 日　11:45～12:00　C12 会場》
「菌類が産生する機能性物質に関する研究」

成川　真隆　（東京大学大学院農学生命科学研究科）《受賞講演：3 月 18 日　11:45～12:00　A01 会場》
「機能性食品成分の味覚シグナルが中枢を介して発動する生理作用の解析」

宮永　顕正　（東京工業大学理学院）《受賞講演：3 月 18 日　14:00～14:15　J33 会場》
「ポリケタイド化合物の分子多様性を生み出す生合成酵素の構造機能研究」

向井　理恵　（徳島大学大学院生物資源産業学研究部）《受賞講演：3 月 18 日　11:45～12:00　B09 会場》
「食品機能学によるプレニルフラボノイドの特性解明」

森　　直紀　（東京大学大学院農学生命科学研究科）《受賞講演：3 月 19 日　14:00～14:15　C12 会場》
「高効率合成を指向したリグナン及びテルペノイドの合成研究」

**【農芸化学女性研究者賞】**（3 件，50 音順）

飯嶋　益巳　（大阪大学産業科学研究所）
「バイオセンサー表層におけるセンシング分子のナノレベル精密整列化に関する研究」

井上　奈穂　（山形大学農学部）
「植物性機能性成分による病態発症改善機能に関する研究」

佐藤ちひろ　（名古屋大学生物機能開発利用研究センター）
「酸性糖鎖ポリシアル酸の新機能の発見とその応用展開」

**【農芸化学若手女性研究者賞】**（3 件，50 音順）

加藤　晃代　（名古屋大学大学院生命農学研究科/名城大学総合研究所）
「有用タンパク質の微生物生産とその産業利用に関する研究」

田中　沙智　（信州大学農学部）
「食品由来機能性成分による免疫調節作用メカニズムに関する研究」

山田　美和　（岩手大学農学部）
「微生物による生分解性プラスチック合成および微生物由来有用酵素に関する研究」

**【農芸化学女性企業研究者賞】**（3 件，50 音順）

小野　佳子　（サントリーウエルネス株式会社）
「ポリフェノールの機能解明に関する研究とその応用開発」

小林（袴田）夕香　（株式会社 J-オイルミルズ）
「きのこ由来レクチンのがん診断への応用」

夏目みどり　（株式会社明治 食機能科学研究所）
「カカオポリフェノールに関する包括的研究」

**【第 14 回農芸化学研究企画賞】**（3 件）

**重点研究領域①　先導的生物活性物質研究と新技術開発**

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

伊藤　康博　（（国研）農業・食品産業技術総合研究機構食品研究部門）
「ゲノム編集による果実成熟制御の解明と高品質果実の作出」

**重点研究領域③　グリーンバイオテクノロジー**

（1）バイオマス資源の生産・供給・利用（有用物質生産プロセス等）に関わるテクノロジー
（2）省資源・省エネルギープロセスに関わるバイオテクノロジー
（3）環境浄化・資源循環に関わるバイオテクノロジー

芦内　　誠　（高知大学農林海洋科学部）
「“ホモキラルポリ-γ-グルタミン酸”生合成装置の分子解析と微生物工学利用」

藤井　克彦　（山口大学創成科学研究科）
「消化汚泥を基質とした水素発酵に関するバイオテクノロジー基盤研究」

**【平成 29 年度日本農学賞受賞者】**（本会推薦）

本会より推薦した下記の者が日本農学賞を受賞いたしました.

2017 年 4 月 5 日（水）東京大学山上会館で開催される日本農学大会において，日本農学賞授与式並びに受賞者講演が予定されています.

受 賞 者：生方　信（北海道大学大学院農学研究院 特任教授）
受賞題目：顕著な活性を有する生理活性物質の発見とその化学生物学的展開

**【2016年（Vol.80）B.B.B. 論文賞（掲載順）】**（10件）

pp.232～240 Keug Tae Kim, Yoko Chiba, Hiroyuki Arai and Masaharu Ishii
Discovery of an intermolecular disulfide bond required for the thermostability of a heterodimeric protein from the thermophile *Hydrogenobacter thermophilus*

pp.399～406 Takashi Koyanagi, Akira Nakagawa, Masashi Kiyohara, Hiroshi Matsui, Atsushi Tsuji, Florin Barla, Harumi Take, Yoko Katsuyama, Koji Tokuda, Shizuo Nakamura, Hiromichi Minami, Toshiki Enomoto, Takane Katayama and Hidehiko Kumagai
Tracing microbiota changes in *yamahai-moto*, the traditional Japanese sake starter

pp.432～439 Tomoaki Anabuki, Miu Tsukahara, Hideyuki Matsuura and Kosaku Takahashi
Tandem photoaffinity labeling of a target protein using a linker with biotin, alkyne and benzophenone groups and a bioactive small molecule with an azide group

pp.694～705 Kohji Nishimura, Erika Matsunami, Shohei Yoshida, Shuhei Kohata, Junji Yamauchi, Mitsuo Jisaka,Tsutomu Nagaya, Kazushige Yokota and Tsuyoshi Nakagawa
The tyrosine-sorting motif of the vacuolar sorting receptor VSR4 from *Arabidopsis thaliana*, which is involved in the interaction between VSR4 and AP1M2, $\mu$1-adaptin type 2 of clathrin adaptor complex 1 subunits, participates in the post-Golgi sorting of VSR4

pp.726～734 Sunita Maharjan, Yasuyoshi Sakai and Jun Hoseki
Screening of dietary antioxidants against mitochondria-mediated oxidative stress by visualization of intracellular redox state

pp.1006～1011 Shingo Miyata, Jun Inoue, Makoto Shimizu and Ryuichiro Sato
Allyl isothiocyanate suppresses the proteolytic activation of sterol regulatory element-binding proteins and *de novo* fatty acid and cholesterol synthesis

pp.1012～1019 Yuki Atago, Jun Shimodaira, Naoto Araki, Nor'azizi Bin Othman, Zuriati Zakaria, Masao Fukuda, Junichiro Futami and Hirofumi Hara
Identification of novel extracellular protein for PCB/biphenyl metabolism in *Rhodococcus jostii* RHA1

pp.1792～1801 Ken Oda, Shiho Terado, Rieko Toyoura, Hisashi Fukuda, Moriyuki Kawauchi and Kazuhiro Iwashita
Development of a promoter shutoff system in *Aspergillus oryzae* using a sorbitol-sensitive promoter

pp.1954～1959 Seiji Kojima, Kanako Hayashi, Saeko Tochigi, Tomonobu Kusano, Jun Kaneko and Yoshiyuki Kamio
Peptidoglycan-associated outer membrane protein Mep45 of rumen anaerobe *Selenomonas ruminantium* forms a non-specific diffusion pore via its C-terminal transmembrane domain

pp.2425～2436 Hiroyoshi Inaba, Takuya Kishimoto, Satoru Oishi, Kan Nagata, Shunsuke Hasegawa, Tamae Watanabe and Satoshi Kida
Vitamin B1-deficient mice show impairment of hippocampus-dependent memory formation and loss of hippocampal neurons and dendritic spines: potential microendophenotypes of Wernicke–Korsakoff syndrome

**【Most-Cited Review Award】**被引用回数　21回

Vol.78, No. 8, pp. 1283～1292
Ryusuke Niwa and Yuko S. Niwa
Enzymes for ecdysteroid biosynthesis: their biological functions in insects and beyond

# 一般講演番号の見方

○ 講演番号の

最初の１桁の数字は講演発表日

２ ⟶ ３月１８日（土）
３ ⟶ ３月１９日（日）
４ ⟶ ３月２０日（月）

次のアルファベットは建物記号、その次の数字二桁は、会場番号

Ａ　　Ａ校舎
Ｂ　　Ｂ校舎
Ｃ　　Ｃ校舎
Ｊ　　Ｊ校舎

（例：Ｊ３３　→　Ｊ校舎３３会場）

次の桁の小文字アルファベットは

ａ　は　午前の部
ｐ　は　午後の部

次の数字は、その会場での講演の順番

たとえば、**２Ａ０８ｐ１４**は、
３月１８日（土）、Ａ校舎０８会場、午後の部、１４番目　の講演です。

○ 講演開始の時間は、次の通りです。

３月１８日（土）、１９日（日）

ａ［ａｍ］（午前）

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| ０１．　9：20 | ０２．　9：35 | ０３．　9：50 | ０４．10：05 | ０５．10：20 |
| ０６．10：45 | ０７．11：00 | ０８．11：15 | ０９．11：30 | １０．11：45 |

【接続時間】 a01～a05：9:10～9:20、a06～a10：10:35～10:45

ｐ［ｐｍ］（午後）

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| ０１．14：00 | ０２．14：15 | ０３．14：30 | ０４．14：45 | ０５．15：00 |
| ０６．15：25 | ０７．15：40 | ０８．15：55 | ０９．16：10 | １０．16：25 |
| １１．16：50 | １２．17：05 | １３．17：20 | １４．17：35 | １５．17：50 |
| １６．18：05 | | | | |

【接続時間】 p01～p05：13:50～14:00、p06～p10：15:15～15:25、p11～p16：16:40-16:50

３月２０日（月）

ａ［ａｍ］（午前）

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| ０１．　9：20 | ０２．　9：35 | ０３．　9：50 | ０４．10：05 | ０５．10：20 |
| ０６．10：35 | ０７．11：00 | ０８．11：15 | ０９．11：30 | １０．11：45 |
| １１．12：00 | １２．12：15 | | | |

【接続時間】 a01～a06：9:10～9:20、a07～a12：10:50～11:00

## 一般講演発表プログラム

1. 講演時間は1題につき，15分（発表11分，質疑3分，交替時間1分）．
2. °は講演者（登壇者）を示す．
3. 座長は，大会プログラム集の 35〜37 ページの座長一覧をご覧ください．
4. 講演番号1文字目（数字）は講演日（2：3月18日，3：3月19日，4：3月20日），2〜4 文字目は講演会場（A01〜J34），5 文字目（英字小文字1字）の a は午前，p は午後，6〜7 文字目（数字2桁）は講演順番（01〜16）．（例）「2A08p14」は，3月18日，A08 会場，午後の部，14 番目の講演となります．

第 2 日（3 月 18 日）

講演番号
開始時間　　演　　題　　発表者氏名（所属）

### A01 会場　午前の部（9:20〜12:00）

動物―個体－生理・栄養・代謝，生体機能，生体制御―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**2A01a01　Study on the sterol regulatory element-binding protein(SREBP)-binding sites in the WD40 domain of SREBP cleavage-activating protein (SCAP)**
**9:20**　°YEN-CHOU KUAN, MAKOTO SHIMIZU, JUN INOUE, RYUICHIRO SATO（The Univ. of Tokyo）

**2A01a02　脂質とタンパク質の消費バランスを制御する生理機構**
**9:35**　°清水宣明，田中廣壽（東大医科研）

**2A01a03　SMXA5 マウスの食餌誘導性脂肪肝の形成機構の解析**
**9:50**　°金森深作，小林美里，鈴木　京，村井篤嗣，堀尾文彦（名大農）

**2A01a04　膵 β 細胞増殖におよぼすアンドロゲンの作用と高グルコースによる影響について**
**10:05**　°原田直樹[1]，乾　博[2]，山地亮一[1]（[1]大阪府大生命環境，[2]大阪府大栄養）

**2A01a05　日本食摂取がヒト腸内細菌叢に与える影響**
**10:20**　°串田　衛，菅原沙恵子，浅野将希，都築　毅（東北大院農）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**2A01a06　A 型 CpG オリゴ DNA による血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼの活性化と LPS 誘導性ショックの抑制効果**
**10:45**　°山本祥也[1,2]，荻田　佑[3]，下里剛士[4]（[1]信州大院･総合工，[2]学振(DC2)，[3]信州大・バイオメディカル研，[4]菌類・微生物セ）

**2A01a07　線虫を用いた抗肥満希少糖スクリーニング法の検討**
**11:00**　°山崎誠志郎[1]，新谷知也[2]，佐藤正資[1]（[1]香川大農，[2]愛媛大院連合農学）

**2A01a08　胆汁酸誘導性脂肪肝発症における血中アディポネクチンの関与**
**11:15**　°加茂佳恵[1]，花井健人[1]，堀　将太[1]，多田幸司[1]，田中愛健[1]，古川裕美子[2]，溝上拓哉[2]，城内文吾[2]，佐藤匡央[2]，清水英寿[3]，原　博[1]，石塚　敏[1]（[1]北大院・農，[2]九大院・農，[3]島根大・生資）

**2A01a09　胆汁酸摂取ラット回腸粘膜における IgA 産生の増加**
**11:30**　°竹内あかり[1]，堀　将太[2]，趙　佳賢[2]，田中愛健[2]，原　博[2]，石塚　敏[2]（[1]北大農，[2]北大院・農）

**2A01a10　機能性食品成分の味覚シグナルが中枢を介して発動する生理作用の解析(奨励賞受賞講演)**
**11:45**　°成川真隆　（東京大学大学院農学生命科学研究科）

### A01 会場　午後の部（14:00〜18:20）

動物―個体－生理・栄養・代謝，生体機能，生体制御―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**2A01p01　心筋結合型アディポネクチンは血圧ではなく，心肥大と相関する**
**14:00**　°井上敬夫[1]，竹森久美子[2]，水口信行[3]，木村雅友[1]，筑後孝章[1]，萩山　満[1]，米重あづさ[1]，森　樹史[3]，前西　修[1]，米谷　俊[2]，伊藤龍生[2]，佐藤隆夫[4]，伊藤彰彦[1]（[1]近大医，[2]近大農，[3]近大ライフサイエンス，[4]近大病院）

**2A01p02　大気暴露時のマアジ *Trachurus japonicus* 骨格筋におけるタンパク質分解動態**
**14:15**　°小南友里，林　達也，時弘哲治，潮　秀樹（東大院）

**2A01p03　マルチオミクス解析によるスジラア筋肉における代謝と概日リズム**
**14:30**　°馬久地みゆき[1,2]，坂田研二[2]，山口智史[3]，小磯雅彦[3]，菊地　淳[2,4,5]（[1]水産機構中央水研，[2]理研環境資源，[3]水産機構西海水研，[4]横市院生命医，[5]名大院生命農）

**2A01p04　エストロゲン受容体 β を介したダイゼインの骨格筋量と筋力への影響**
**14:45**　°河田夏初，原田直樹，山地亮一（大阪府大院 生命環境）

**2A01p05　好熱性新菌種 *Bacillus hisashii* N-11[T]株の経口給与がマウスの大腿直筋の代謝機能に及ぼす影響**
**15:00**　°岩田菖子[1]，須田　亙[2,3]，福田真嗣[4,5]，中西裕美子[5]，加藤　完[5]，大野博司[5]，服部正平[2,6]，児玉浩明[1]，宮本浩邦[1,3,5,7]（[1]千葉大院・融合，[2]東京大院・新領域，[3]慶應大・医，[4]慶應大・先端生命，[5]理研・IMS，[6]早大・先進理工，[7]サーマス）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**2A01p06　恒常的 BCAA 分解亢進は運動トレーニング効果にどのように影響するか**
**15:25**　°北浦靖之，Xu Minjun，寺井智勇，新土大地，下村吉治（名大農）

**2A01p07　マグネシウム欠乏食摂取ラット大腿骨における遺伝子発現解析**
**15:40**　°矢後拓己[1]，石島智子[1]，阿部啓子[1,2]，岡田晋治[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]神奈川科学技術アカデミー）

**2A01p08　リン供給源の形態の違いが，高リン食摂取ラットの骨代謝に及ぼす影響の包括的検討**
**15:55**　°鳴神未稀[1]，矢後拓己[1]，石島智子[1]，阿部啓子[1,2]，岡田晋治[1]（[1]東大院農生科･応生化，[2]神奈川科学技術アカデミー）

**2A01p09　カイコウオオソコエビ外骨格の分析**
**16:10**　°小林英城[1]，下重裕一[2]，中島義賢[2]，荒井　渉[1]，高見英人[1]（[1]海洋機構，[2]東洋大バイオナノ）

**2A01p10　アルキルピラジン化合物の恐怖行動誘起作用の構造活性相関について**
**16:25**　°長田和実[1]，宮園貞治[2]，柏柳　誠[2]（[1]北医療大歯，[2]旭川医大医）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**2A01p11　自閉症様行動をレスベラトロールは改善する**
**16:50**　°菊池昇平[1]，日出間志寿[1]，堀江謙吾[1]，矢内隆章[2]，高田良二[2]（[1]東北大農，[2]キリン㈱ R&D）

**2A01p12　Oxytocin 受容体発現ニューロンによる母性行動制御**
**17:05**　°日出間志寿[1]，宮崎慎至[1]，大塚彩乃[1]，堀江謙吾[1]，矢田沙織[1]，菊池昇平[1]，木野崎萌[1]，水上浩明[2]，西森克彦[1]（[1]東北大農，[2]自治医科大学）

**2A01p13　線虫 *C. elegans* の幼虫休眠を制御する短鎖 C 末端アミドペプチド FLP-21 の機能解析**
**17:20**　°国松友香，松下健次朗，岩崎　崇，河野　強（鳥取大農）

**2A01p14　線虫 *C. elegans* の休眠を制御する短鎖ペプチド NLP-24 とその受容体 NPR-17 の機能解析**

**17:35** ○原田敦美，岩崎　崇，河野　強（鳥取大院農）

**2A01p15　妊娠後期における糖質摂取状態がマウスの行動及びストレス応答に及ぼす影響**

**17:50** ○小森　誠，　平井　静，　越野由希絵，　西野光里，石井彩香，戸田絢子，江頭祐嘉合（千葉院・園芸・応生化）

**2A01p16　自律神経活動を指標とした合わせ出汁の抗疲労効果**

**18:05** ○森滝　望[1]，山崎英恵[2]，井上和生[1]（[1]京大農，[2]龍大農）

## A02 会場　午前の部（9:20〜12:00）

動物―細胞－細胞機能，細胞骨格，オルガネラ，輸送体，細胞接着，細胞内輸送―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**2A02a01　コレステロール認識配列 CRAC は，ヒト ABCG4 のコレステロール輸送において重要である**

**9:20** ○見月俊吾[1]，木村泰久[1]，木岡紀幸[1]，松尾道憲[2]，植田和光[1,3]（[1]京大院・農・応用生命，[2]京女・家政・食物栄養，[3]京大・物質-細胞統合システム拠点）

**2A02a02　Analysis of thermostabilizing mechanism of multidrug transporter**

**9:35** ○Yilun WANG[1]，　Shuichi INOUE[1]，　Noriyuki KIOKA[1]，Yasuhisa KIMURA[1]，Kazumitsu UEDA[1,2]（[1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. of Agri., Kyoto Univ, [2]iCeMS., Kyoto Univ）

**2A02a03　脂質輸送タンパク質 ABCA1 とその機能調節タンパク質間の相互作用機構の解析**

**9:50** ○梶友里恵[1]，藤林果奈[2]，佐伯和弘[1,2]，田口善智[1,2]（[1]近畿大院 生物理工，[2]近畿大 生物理工 遺伝子）

**2A02a04　マウス ES 細胞において抗がん剤排出タンパク質 BCRP1（ABCG2)と相互作用するタンパク質の探索**

**10:05** ○岡迫知弘[1]，　青木隆之介[1]，　梶友里恵[2]，　西垣内佑香[1]，桑山　萌[1]，　坂手祐貴[1]，　甲田美樹[1]，　有田奈央[1]，　吉田誠希[1]，松井豪志[1]，　奥田宗広[1]，　佐伯和弘[1,2]，　三谷　匡[2,3]，　田口善智[1,2]（[1]近畿大 生物理工 遺伝子，[2]近畿大院 生物理工，[3]近畿大 先端研）

**2A02a05　乳酸菌由来脂肪酸によるコレステロールトランスポーター ABCA1 と ABCG1 の活性化**

**10:20** ○吉井未貴[1]，　岸野重信[2]，　植田和光[2,3]，　小川　順[2]，松尾道憲[1]（[1]京女大家政，[2]京大院農，[3]京大 iCeMS）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**2A02a06　乳酸菌由来脂肪酸によるマクロファージにおける炎症抑制作用の解析**

**10:45** ○西岡杏菜[1]，　斎藤貴将[2]，　岸野重信[2]，　植田和光[2,3]，小川　順[2]，松尾道憲[1]（[1]京女大家政，[2]京大院農，[3]京大 iCeMS）

**2A02a07　NPC1L1 の脂溶性物質結合活性の解析**

**11:00** ○福田恭子[1]，千場智尋[2,3]，植田和光[3,4]，松尾道憲[1]（[1]京女大・家政，[2]ファンケル総研，[3]京大 iCeMS，[4]京大院・農）

**2A02a08　哺乳動物細胞小胞体内における LDL 受容体新生ポリペプチド鎖の酸化的フォールディング機構の解析**

**11:15** ○門倉　広，太宰　結，中村織江，稲葉謙次（東北大多元研）

**2A02a09　小胞体ストレス応答に関与する XBP1u が SRP 経路に入る為の条件解析**

**11:30** ○桶谷真希，　曽川愛守榮，　大古殿美加，　苅田　聡，河野憲二（奈良先端大バイオ）

**2A02a10　膵島 β 細胞における阻害剤をもちいた IRE1 α の機能解析**

**11:45** ○佐藤仁美[1]，　芝　陽子[2]，　土屋雄一[1]，　斉藤美知子[1]，河野憲二[1]（[1]奈良先端大バイオ，[2]岩手大理工学部化学生命理工学科生命コース）

## A02 会場　午後の部（14:00〜18:05）

動物―細胞－細胞機能，細胞骨格，オルガネラ，輸送体，細胞接着，細胞内輸送，細胞－情報伝達，細胞応答，分化制御，メタボローム―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**2A02p01　新規蛍光プローブ SPiDER-β Gal による細胞老化マーカー SA-β-gal の迅速検出**

**14:00** ○小松恭佳（同仁化学研究所）

**2A02p02　ビネキシンのホスファチジン酸結合領域の解析**

**14:15** ○伊藤有亮[1]，　市川尚文[1]，　折田雄一郎[1]，　安部真人[1]，木村泰久[1]，植田和光[1,2]，三芳秀人[1]，木岡紀幸[1]（[1]京大・農，[2]京大・iCeMs）

**2A02p03　ビネキシン α の両親媒性ヘリックスはビンキュリンの構造変化に必要である**

**14:30** ○日野直也[1]，　市川尚文[1]，　木村泰久[1]，　植田和光[1,2]，木岡紀幸[1]（[1]京大・農・応生，[2]京大・iCeMS）

**2A02p04　細胞収縮力発生におけるビネキシンファミリータンパク質の役割**

**14:45** ○市川尚文[1]，　松井　翼[2,3]，　荒木智彦[3]，　喜多真弘[1]，植田和光[1,4]，出口真次[2,3]，木岡紀幸[1]（[1]京大農，[2]阪大基礎工，[3]名工大工，[4]京大 iCeMS）

**2A02p05　G-actin に対する人工抗体の細胞導入と機能評価**

**15:00** ○町田奈々子[1]，秋山祐亮[2]，村上寛和[2]，Heinis Christian[3]，Bertoldo Davide[3]，山崎祥他[2]，原田昌彦[1,2]（[1]東北大農，[2]東北大院農，[3]EPFL・LPPT）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**2A02p06　カルシウム結合タンパク質 ALG-2 とアポトーシス促進タンパク質 CDIP1 と Scotin の相互作用**

**15:25** ○犬飼隆太，鈴木千尋，京　卓志，清水育美，高原照直，柴田秀樹，牧　正敏（名大院生命農）

**2A02p07　小胞体でのミスフォールドタンパク質蓄積に伴うレドックス異常回復剤の同定とその機序について**

**15:40** ○奥　勇紀[1]，　奥野友紀子[2]，　萩原正敏[2]，　寶関　淳[3,4]，阪井康能[3,4]（[1]京大院・総合生存，[2]京大院医，[3]京大院農・応用生命，[4]京大・生理化学）

**2A02p08　高浸透圧ストレス誘導性オートファジーの形態および分子メカニズムの解析**

**15:55** ○田村直輝，和栗　聡（福島医大・医）

**2A02p09　リソソーム関連タンパク質の細胞内局在性の解析**

**16:10** ○家治葉子，桑田沙羅，片岡孝夫（京工繊）

**2A02p10　ヒト間葉系幹細胞株 UE7T-13 細胞において HNF4 α および HNF1 α の共発現は MTP の発現を誘導する**

**16:25** ○佐々木玲[1,2]，　樋渡一之[2]，　熊谷昌則[2]，　畠　恵司[2]，小林正之[1]（[1]秋田県大院，[2]秋田総食研セ）

**p11〜p15 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**2A02p11　アミノ酸は細胞内カルシウム濃度上昇を介して mTORC1 経路を活性化する**

**16:50** ○高原照直，中村奈央，王　　悦，渡邊穂実，柴田秀樹，牧　正敏（名大院生命農）

**2A02p12　運動及び栄養条件の変化による CXCL10 の発現変動**

**17:05** ○石内友里，佐藤　整，川口英夫，根建　拓（東洋大生命）

**2A02p13　グリセルアルデヒド由来メイラード反応後期段階生成物と RAGE による相互作用の解析**

**17:20** ○藤野峻行[1]，　村上庸人[1]，　三浦　彩[1]，　吉橋なおみ[1]，臼井照幸[2]，渡辺寛人[1]，早瀬文孝[1]（[1]明治大農，[2]女子栄養大）

**2A02p14　ケンフェロールとルテオリンによる薬物代謝酵素発現調節機構について**

**17:35** ○中井里香，山下陽子，芦田　均（神戸大農）

**2A02p15　デキサメタゾン誘導性筋タンパク分解抑制効果を有する食品成分の探索とその作用機構の解明**
**17:50**　◦久保田祐介，芦田　均（神戸大農）

## A03 会場　午前の部（9:20〜12:00）

### 動物―遺伝子－構造，発現制御，機能，修飾，トランスクリプトーム，エピジェネティクス―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**2A03a01　社会的認知記憶課題を用いた新規性認識メカニズムの組織学的解析**
**9:20**　◦谷水俊之[1]，喜田　聡[1,2]（[1]東京農大院・農・バイオ，[2]JST, CREST）

**2A03a02　恐怖記憶固定化に対するパルブアルブミン陽性ニューロンの役割**
**9:35**　◦矢部穂乃佳[1]，石川理絵[1]，喜田　聡[1,2]（[1]東京農大院・農・バイオ，[2]JST, CREST）

**2A03a03　光遺伝学的手法を用いた想起後の恐怖記憶制御に対する海馬の役割の解析**
**9:50**　◦長葭大海[1]，福島穂高[1,2]，喜田　聡[1,2]（[1]東京農大・院・バイオ，[2]CREST,JST）

**2A03a04　SUMO 化を介したパーキンソン病関連転写因子 PARIS の活性制御**
**10:05**　◦西田　有，山田芳司（三重大・先端科学研究支援センター）

**2A03a05　急性期の筋萎縮過程における遺伝子発現変動解析**
**10:20**　◦原田哲仁[1]，　岩崎　健[1]，　横田和也[2]，　岡田誠司[2]，大川恭行[1]（[1]九大生医，[2]九大医）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**2A03a06　遺伝性早老症ウェルナー症候群患者細胞は WRN タンパク質欠損に起因する細胞老化を呈する**
**10:45**　◦澁谷修一[1,2]，飯塚絹江[1]，横手幸太郎[1]，清水孝彦[1]（[1]千葉大院医，[2]日本学術振興会特別研究院 DC1）

**2A03a07　乳がん細胞におけるクロモドメインタンパク質 CBX2 の機能解明と細胞系を用いた CBX2 阻害剤スクリーニング**
**11:00**　◦横山　翔[1,2]，　伊藤昭博[1,3]，　波多野稔子[1]，　松岡聖二[4]，KUMAR Ashutosh[5], ZHANG Kam[5], 浜本牧子[2], 吉田　稔[1,3,4]（[1]理研・化学遺伝，[2]明治大院・農・生命科学，[3]理研・環境資源・ケミカルゲノミクス，[4]理研・環境資源・創薬シード，[5]理研・ライフサイエンス・構造バイオ）

**2A03a08　内因性 SIRT2 阻害剤としての *N*-アシルセロトニンの発見**
**11:15**　◦坂本和貴[1,2]，　伊藤昭博[1,3]，　工藤紀雄[4]，　芹澤茉里子[1]，中田明子[4], 吉田　稔[1,2,3,4]（[1]理研・化学遺伝, [2]埼玉大院・理工, [3]理研・環境資源・ケミカルゲノミクス，[4]理研・環境資源・創薬シード）

**2A03a09　カイコガ pH 感受性塩素チャネルの超多様化により生じる薬理学的特性の変化**
**11:30**　◦奥原大樹，伊原　誠，松田一彦（近畿大・農）

**2A03a10　ニワトリ組織におけるキチナーゼ遺伝子発現レベルとその酵素学的機能の解析**
**11:45**　◦田畑絵理，樫村昭徳，大野美紗，坂口政吉，小山文隆（工学院大工）

## A03 会場　午後の部（14:00〜18:20）

### 動物―遺伝子－構造，発現制御，機能，修飾，トランスクリプトーム，エピジェネティクス，タンパク質－構造，機能，活性，修飾，分解，局在，プロテオーム―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**2A03p01　CHERP の選択的 mRNA スプライシング制御機構解析**
**14:00**　◦山中靖貴，増田誠司（京大院生命科学）

**2A03p02　細胞周期制御に関与する長鎖ノンコーディング RNA の機能解析**
**14:15**　◦神武洋二郎，　苗村円佳，　井上恭敏，　岡本春奈，田原圭一郎（近大産理工）

**2A03p03　関節リウマチのモデル滑膜繊維芽細胞由来のエクソソームマイクロ RNA の解析**
**14:30**　◦高村陽介[1]，　里村　淳[1,2]，　青木　航[1,3]，　芝崎誠司[4]，植田充美[1,3]（[1]京大農，[2]日本学術振興会特別研究員(DC1)，[3]京都バイオ計測センター，[4]兵庫医療大薬）

**2A03p04　遺伝学的相補実験系を用いたヒストンバリアント H2A.Z の機能解析**
**14:45**　◦成宮　巧[1]，　日下部将之[2]，　堀越直樹[3]，　奥　裕之[2]，高橋大輔[2]，胡桃坂仁志[3]，原田昌彦[2]（[1]東北大学農学部，[2]東北大学大学院農学研究科，[3]早稲田大学・院・先進理　工 / 理工研 / 構造創薬研）

**2A03p05　ヒストンバリアント H2A.Z の分子進化学的保存性の解析**
**15:00**　◦北川紗帆[1]，　日下部将之[2]，　奥　裕之[2]，　高橋大輔[2]，成宮　巧[1]，中林　悠[3]，関　政幸[3]，原田昌彦[1,2]（[1]東北大農，[2]東北大院農，[3]東北医科薬科大薬）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**2A03p06　CRISPR/Cas9 System による，高効率で正確なノックインを可能とするベイト配列の探索**
**15:25**　◦村上　悠[1]，安齋　賢[2]，米村明莉[1]，木下政人[1]（[1]京大農，[2]遺伝研）

**2A03p07　ゲノム編集技術を用いた海産養殖魚の品種改良**
**15:40**　◦岸本謙太[1]，　鷲尾洋平[2]，　豊田　敦[3]，　吉浦康寿[4]，家戸敬太郎[2]，木下政人[1]（[1]京大農，[2]近大水研，[3]遺伝研，[4]水研機構瀬水研）

**2A03p08　医薬品応用を目指したニワトリ由来抗体のヒト化**
**15:55**　◦庄屋雄二，　斉藤憲二，　石田有希子，　昆　良子，豊浦雅義，金　武祚（㈱ファーマフーズ）

**2A03p09　腸管上皮細胞由来抗菌性レクチン RegIV の腸内フローラ制御機能の解析**
**16:10**　◦横尾拓哉[1]，佐藤道夫[2]，渡辺寛人[1]（[1]明治大農・生命科，[2]明治大農・農芸化）

**2A03p10　グリセルアルデヒド由来メイラード反応生成物 GLAP による RAGE を介した細胞毒性**
**16:25**　◦倉知遼太郎[1]，　村上庸人[1]，　藤野峻行[2]，　臼井照幸[3]，早瀬文孝[2]，渡辺寛人[1]（[1]明治大農・生命科，[2]明治大農・農芸化，[3]女子栄養大）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**2A03p11　アコヤガイ稜柱層カルサイト結晶形成に関与するキチナーゼの働き**
**16:50**　◦近都浩之[1]，　奥村大河[2]，　根岸瑠美[3]，　小暮敏博[2]，作田庄平[1]，鈴木道生[1]（[1]東大院・農生科・応生化，[2]東大院・理学科・地惑科，[3]東大・分生研）

**2A03p12　アコヤガイ（*Pinctada fucata*）の真珠層石灰化に関与するカルシウムイオン応答タンパク質の同定と機能解析**
**17:05**　◦松浦晃宙[1]，　吉村　航[1]，　渥美貴史[2]，　土橋靖史[3]，竹内　猛[4]，　佐藤矩行[4]，　根岸瑠美[1]，　作田庄平[1]，　井村祐己[1]，吉村悦郎[5]，鈴木道生[1]（[1]東大院農，[2]三重県庁，[3]三重水研，[4]OIST，[5]放送大教養）

**2A03p13　ウロコフネタマガイ（*Chrysomallon squamiferum*）由来の鉄結合物質の探索**
**17:20**　◦松田大輝[1]，　有賀智子[1]，　鈴木庸平[2]，　根岸瑠美[1]，井村祐己[1]，吉村悦郎[3]，鈴木道生[1]（[1]東大院農，[2]東大院理，[3]放送大教養）

**2A03p14　モデル生物としてのメダカにおける血液凝固に必須なタンパク質架橋化酵素の機能解析**
**17:35**　◦人見清隆，堀水里麻，奥谷冬穂，渡邊優子，辰川英樹（名大院創薬）

**2A03p15　肝線維化におけるタンパク質架橋化酵素の役割**
**17:50**　◦中川晴加[1]，　谷　優治[2]，　大津里紗[2]，　辰川英樹[2]，

人見清隆[2]（[1]名大農，[2]名大院創薬）

**2A03p16　hSOCS2 タンパク質の 30 番目のセリンのリン酸化は自身の分解を促進する**

**18:05**　◦宮本　梓[1]，舛廣善和[1,2]，関泰一郎[1,3]，司馬　肇[1,2]（[1]日大院生物資源科学応用生命，[2]日大生物資源科学応用生物，[3]日大生物資源科学生命化学）

## A04 会場　午前の部（9:20〜11:45）

### 食品―食品機能・栄養－タンパク質・アミノ酸代謝―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**2A04a01　畑で作る高栄養価タンパク質の開発と食品用途**

**9:20**　◦横田明穂[1]，　三林有紀[1,2]，　小川太郎[1,3]，　土井　安[4]，和田宗隆[4]，　吉村　守[5]，　福本拓元[3]，　出村　拓[2]，　西永正博[1]（[1]植物ハイテック研，[2]奈良先端大バイオ，[3]ユーグレナ，[4]パンドラファームグループ，[5]大和ハウス）

**2A04a02　アミノ酸欠乏による fibroblast growth factor 21 発現増加機構の解析**

**9:35**　◦島村紘平[1]，増澤(尾﨑)依[2]，竹中麻子[1]（[1]明治大農，[2]日大生資科）

**2A04a03　L-シトルリンの経口投与により転写共役因子依存的にマウス骨格筋の血管数が増加した**

**9:50**　◦森本茉穂[1]，　畑澤幸乃[1,2]，　大西拓己[1]，　南貴美子[1]，鈴木貴視[3]，森田匡彦[3]，亀井康富[1]　（[1]京府大，[2]日本学術振興会，[3]協和発酵バイオ株式会社）

**2A04a04　骨格筋において PGC-1 αが分岐鎖アミノ酸による mTOR シグナルの活性化を媒介する**

**10:05**　◦南貴美子，吉村亮二，亀井康富（京府大農）

**2A04a05　2 型糖尿病モデル ZDF ラットの骨・ミネラル代謝異常に対する米糠タンパク質の有効性**

**10:20**　◦菅木省吾[1]，　久保田真敏[2]，　渡邊令子[3]，　橋本博之[4]，原田幸和[4]，　細島康宏[5]，　斎藤亮彦[5]，　笹川一郎[6]，　藤村　忍[1,2]，門脇基二[1,2]（[1]新潟大院自然研，[2]新潟大農，[3]新潟県立大，[4]築野食品工業基礎研，[5]新潟大院医歯，[6]日本歯大新歯）

**a06〜a09 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**2A04a06　米胚乳タンパク質摂取が血清 IgE 濃度に及ぼす影響**

**10:45**　◦鎌田拓也[1]，　原　　崇[1,2]，　久保田真敏[2]，　藤井幹夫[3]，藤村　忍[1,2]，門脇基二[1,2]（[1]新潟大院自然科学，[2]新潟大農，[3]㈱亀田製菓）

**2A04a07　緑葉タンパク質の酵素消化物の一斉分析により発見した新しい抗不安様ペプチド**

**11:00**　◦木村彩映子[1]，　山本あかね[1]，　倉林篤史[2]，　佐藤　大[2]，鈴木秀幸[2]，　金本龍平[1]，大日向耕作[1]（[1]京大院農食品生物，[2]かずさ DNA 研究所・バイオ研究開発部）

**2A04a08　乳たんぱく質素材の消化性と GLP-1 分泌刺激活性に関する検討**

**11:15**　◦小松陽介[1,2]，　和田泰明[1,2]，　井上大輔[3]，　和泉裕久[2]，清水隆司[2]，武田安弘[2]，比良　徹[3]，原　　博[3]（[1]北海道大学産学・地域協働推進機構 FMI 推進本部，[2]森永乳業㈱健康栄養科学研究所，[3]北海道大学農学研究院）

**2A04a09　アンセリン含有サケエキス摂取によるテニスパフォーマンス向上効果**

**11:30**　◦小西達也[1]，高橋義宣[1]，椎名康彦[1]，駒澤真人[2]，板生研一[2,4]，平田盛子[3]，杉山美沙子[3,4]（[1]マルハニチロ株式会社，[2]WIN フロンティア株式会社，[3]パーム・インターナショナル・テニス・アカデミー，[4]順天堂大学医学部）

## A04 会場　午後の部（14:00〜18:05）

### 食品―食品化学－タンパク質，アミノ酸―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**2A04p01　小角散乱法で見るグリアジン水和凝集体のナノ構造に及ぼす食塩添加効果**

**14:00**　◦佐藤信浩[1]，　大場洋次郎[1]，　井上倫太郎[1]，　杉山正明[1]，東野ゆうき[2]，裏出令子[2]（[1]京大原子炉，[2]京大院農）

**2A04p02　グリアジン水和凝集体のナノスケール構造形成におけるグルタミン残基の役割**

**14:15**　◦久保田秀人[1]，　佐藤信博[2]，　杉山正明[2]，　井上倫太郎[2]，東野ゆうき[1]，裏出令子[1]（[1]京大院農・農学，[2]京大原子炉）

**2A04p03　大豆形質転換体を用いて作成した組み換え型小麦 γ-グリアジンの解析**

**14:30**　◦松岡祐樹[1]，　奥田英子[1]，　山田哲也[2]，　裏出令子[1]，丸山伸之[1]（[1]京大農，[2]北大農）

**2A04p04　ε-ポリリシンおよびデキストランとの複合体化による大豆 β-コングリシニンの機能改変**

**14:45**　◦松本拓也，橋本健史，服部　誠，好田　正（農工大農）

**2A04p05　ダイズ加工食品の鉄成分に対するフェリチンの寄与**

**15:00**　◦増田太郎[1]，後藤文之[2]，吉原利一[2]　（[1]京大農，[2]電中研）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**2A04p06　米アルブミンの二次機能特性と熱耐性**

**15:25**　◦濱田　彩[1]，　戸原隆吉[1]，　西田祥子[1]，　秋間彩香[3]，稲　成信[2]，赤尾　真[1,2]，熊谷　仁[3]，熊谷日登美[1,2]（[1]日大生資科，[2]日大院生資科，[3]共立女子家政）

**2A04p07　鶏卵貯蔵中における ovalbumin-related protein X の構造変化**

**15:40**　◦赤澤隆志[1]，野々村直樹[2]，小川雅廣[2]，早川　茂[2]（[1]愛媛大院連合農，[2]香川大農）

**2A04p08　ペクチンとの複合体化による β-ラクトグロブリンの機能改変**

**15:55**　◦小田島知未，好田　正，服部　誠（東農工大農）

**2A04p09　可食性バイオハイブリッド創出による β-ラクトグロブリンの高機能化**

**16:10**　◦池田理沙，堀内建吾，川合伸也，好田　正，服部　誠（東農工大農）

**2A04p10　甘味タンパク質ソーマチンの甘味発現機構**

**16:25**　◦光本麻佑子，　大久保喬平，　三上文三，　谷　史人，桝田哲哉（京大農）

**p11〜p15 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**2A04p11　豆味噌におけるコク寄与成分の解析**

**16:50**　◦井上　裕[1,2]，　佐治明歩[1]，　勝又忠与次[2]，　渡辺寛人[1]，早瀬文孝[1]（[1]明治大農，[2]MC フードスペシャリティーズ株式会社）

**2A04p12　渋味マスキング剤の開発を志向するロスマリン酸結合性大豆ペプチドの網羅的解析**

**17:05**　◦伊藤圭祐[1]，増田百花[1]，石井剛志[2]（[1]静県大・食栄，[2]神戸学院大・栄）

**2A04p13　鶏肉のイミダゾールジペプチドの加工特性に関する研究**

**17:20**　◦神力はるな[1]，　近藤知巳[2]，　永浜清子[1]，　水光正仁[1]，福井敬一[2]，　榊原陽一[1]（[1]宮崎大院 農工総合，[2]宮崎 JA 食開研）

**2A04p14　Effects of sulfur-containing amino acids from onion extract on the production of testosterone and progesterone in mouse I-10 cells.**

**17:35**　◦Hsin-Jung Ho[1]，　Hitoshi Shirakawa[1]，　Yuya Nakayama[2]，Shigeru Hiramoto[2]，Hiroyuki Ikemoto[2]，Michio Komai[1]（[1]Lab Nutri., Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [2]Nisshin Pharma Inc.）

**2A04p15　豆類の生育ステージ，登熟期の GABA 量の比較**

**17:50**　◦蓑島良一[1,2]，椎葉　究[2]（[1]日清オイリオグループ株式会社，[2]東京電機大学理工学研究科）

## A05 会場　午前の部（9:35〜12:00）

食品―食品工学－物性，分析―

**a02〜a05 発表者の接続時間 9:25〜9:35**

**2A05a02　塩化ナトリウムを含む高分子水溶液の極限粘度とみかけの粘度の解析**
**9:35**　◦邱　泰瑛[1]，佐藤之紀[1]，宮脇長人[2,3]（[1]北見工大，[2]石川県大，[3]東京海洋大）

**2A05a03　電気物性を用いたレトルト殺菌行程中の米飯の品質評価**
**9:50**　◦桑原悠史[1]，川井清司[2]，羽倉義雄[2]（[1]広大生生，[2]広大院生物圏）

**2A05a04　高速せん断による高アミロース米ゲルにレトルト加熱処理が及ぼす効果**
**10:05**　◦井坂圭良，柴田真理朗，萩原知明（海洋大）

**2A05a05　米菓の物性と構造が口どけ感に及ぼす影響**
**10:20**　◦細井友加里[1]，山谷健太[2]，竹井　亮[2]，丸山健太郎[2]，西津貴久[1]（[1]岐阜大・応生，[2]亀田製菓株式会社）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**2A05a06　Quality Characteristics, Physiological Properties, and SDS-PAGE of Mozzarella Type Soybean Cheese**
**10:45**　◦Jin Kyung KIM，Moon-Hee LEE，Sook-Young LEE（Chung-Ang University , Department of food and nutrition）

**2A05a07　ゲル状食品の弾性挙動の解析**
**11:00**　◦鬼島直子[1]，砂押　諒[1]，石川大太郎[1,2]，藤井智幸[1,2]（[1]東北大農，[2]東北大院）

**2A05a08　冷菓の摂食・嚥下特性とおいしさに関する研究**
**11:15**　◦佐々木慶一[1]，井上恵介[1]，渡部加苗[1]，岩井　大[1]，池田三知男[1]，堀　一浩[2]，小野高裕[2]（[1]森永乳業・研究本部，[2]新潟大学大学院医歯学総合研究科）

**2A05a09　Enzymatic interesterification of soybean oil, palm stearin and coconut stearin blends**
**11:30**　◦Lakum Ruttiya，Sonwai Sopark（Silpakorn Univ.）

**2A05a10　油滴サイズの異なるフラワーペーストの口どけ食感の解析　〜繰り返し圧縮における物性・構造の変化〜**
**11:45**　◦山下智史[1]，河原田啓希[2]，古川周平[2]，中村　卓[1]（[1]明治大農・農化，[2]オリエンタル酵母工業㈱・食品研究所）

## A05 会場　午後の部（14:00〜18:05）

食品―食品工学－物性，分析―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**2A05p01　超音波特性を利用した等温保持中の硬化ヤシ油結晶化過程のモニタリング**
**14:00**　◦森　大獎[1]，勝野那嘉子[2]，増子朝貞[3]，松浦傳史[3]，西津貴久[2]（[1]岐阜大院・応生，[2]岐阜大・応生，[3]三菱化学フーズ㈱）

**2A05p02　杵つき餅の製造過程における力学的物性のインライン計測**
**14:15**　◦植松周作[1]，川井清司[2]，羽倉義雄[2]（[1]広大生生，[2]広大院生物圏）

**2A05p03　生シラスおよび冷凍生シラスの力学的物性を用いた鮮度評価**
**14:30**　◦平良佳雅[1]，川井清司[2]，羽倉義雄[2]（[1]広大生生，[2]広大院生物圏）

**2A05p04　MIP 発光分光分析によるミネラルー斉分析を用いた農産物の特徴把握方法の検討**
**14:45**　◦藤野加奈子，水上浩之（熊本県産技セ）

**2A05p05　Wilhelmy 法を用いたコール酸ナトリウム水溶液の表面張力の測定**
**15:00**　◦島　元啓，水川雄揮（石川県立大生物資源）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**2A05p06　透析膜中の拡散速度解析による水溶性食物繊維へのグルコース結合量の評価法**
**15:25**　◦中村華恵[1]，稲　成信[3]，赤尾　真[2,3]，熊谷日登美[2,3]，熊谷　仁[1]（[1]共立女子家政，[2]日大生物資源科学，[3]日大院生物資源科学）

**2A05p07　LC/MS を用いた β-リパーゼ阻害活性試験法**
**15:40**　◦大木伽耶子，隅谷栄伸（公益財団法人 東洋食品研究所）

**2A05p08　自己駆動型クーロメトリーを用いた日本酒モロミ中のピルビン酸およびグルコース定量**
**15:55**　◦緒方七海，羽様晃司，北村　誠，三木功次郎（奈良高専）

**2A05p09　親水性クロマトグラフィーと高分解能質量分析によるジペプチドの網羅解析**
**16:10**　◦佐藤　大[1]，倉林篤史[1]，大日向耕作[2]，鈴木秀幸[1]（[1]かずさ DNA 研究所・バイオ研究開発部，[2]京大院農食品生物）

**2A05p10　$^{1}$H-NMR メタボローム解析を用いた玄米米糠麹（FBRA）の品質評価に関する基礎的検討**
**16:25**　◦堀江裕紀子[1]，根本英幸[1]，池川繁男[2]，熊木康裕[3]，大西裕季[3]，久米田博之[3,4]，出村　誠[3,4]，相沢智康[3,4]（[1]㈱コーケン，[2]㈱玄米酵素，[3]北大院・生命科学，[4]北大・GI-CoRE ソフトマターGS）

**p11〜p15 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**2A05p11　$^{31}$P NMR を用いた卵黄変性の動的構造解析**
**16:50**　◦若松弘起[1]，半田明弘[2]，千葉一裕[1]（[1]東農工大院農，[2]キユーピー㈱研究開発本部）

**2A05p12　岐阜県内トウゲシバにおける産地・季節間の huperzineA 含量の比較**
**17:05**　◦川合美有紀[1]，加藤拓也[2]，原　英彰[3]，大山雅義[3]，河野宏行[2]，横山慎一郎[1]（[1]岐阜産技セ，[2]アピ㈱，[3]岐薬大）

**2A05p13　オリーブの花より分離した耐塩性酵母で醸造した醤油の特徴**
**17:20**　◦大西茂彦[1]，浅井貴子[2]，松井幸一[3]　（[1]香川産技セ発食，[2]香川産技セ食研，[3]株式会社ヤマヒサ）

**2A05p14　NMR によるシイタケ生理活性成分の抽出法の影響について**
**17:35**　◦中川克彦[1]，井下章子[1]，藤信幸美[1]，堤　主計[1]，間淵通昭[1]，早瀬伸樹[1]，森永弘志[2]，宮部慎司[2]（[1]新居浜高専，[2]㈱大愛）

**2A05p15　各種玄米に対する湿熱処理条件が及ぼす玄米中成分への影響**
**17:50**　◦春日景太[1]，榎　康明[2]，最上真鈴[1]，奥村寿子[1]，菅原正義[1]（[1]長岡高専，[2]ブルボン）

## A06 会場　午前の部（9:20〜12:00）

食品―食品機能・栄養－神経，内分泌，味覚・食欲―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**2A06a01　認知機能低下を軽減するロスマリン酸の効果**
**9:20**　◦山下　玲[1]，長谷知輝[1]，浜口　毅[2]，篠原もえ子[2]，山田正仁[2]，阿部啓子[1,3]，小林彰子[1]（[1]東大院農，[2]金沢大医，[3]神奈川科学技術アカデミー）

**2A06a02　ロスマリン酸による脳内モノアミン変動の解析**
**9:35**　◦長谷知輝[1]，山下　玲[1]，宍戸　駿[1]，豊田　集[1]，濱口　毅[2]，篠原もえ子[2]，山田正仁[2]，阿部啓子[1,3]，小林彰子[1]（[1]東大院農，[2]金沢大医，[3]神奈川科学技術アカデミー）

**2A06a03　アミロイド β 誘導性神経細胞死および Tau リン酸化亢進に及ぼす黒米糠抽出物の影響**
**9:50**　◦石橋実学[1]，佐古秀輝[1]，原　崇[1]，池内　健[2]，城斗志夫[1]，中村澄子[4]，西澤正豊[2]，山崎　彬[3]，小林　篤[3]，大坪研一[4]（[1]新潟大農，[2]新潟大脳研，[3]越後製菓，[4]新潟薬大応用生命）

**2A06a04　野菜抽出物の抗アルツハイマー病効果**
**10:05**　○宮崎穂菜実[1]，渡辺みなみ[2]，岡本遥子[3]，片山　茂[3]，中村宗一郎[3]，米倉真一[1,2,3]（[1]信大院総合工，[2]信大農，[3]信大バイオメディカル研）

**2A06a05　Comparative evaluation of phenolic compounds and neuroprotective activity of cultivar extracts derived from Chrysanthemum morifolium flowers**
**10:20**　○Dongjian MA[1]，Yutaka WAKOU[2]（[1]Hachinohe IT mecha. & biotech.，[2]Hachinohe IT biochem.）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**2A06a06　大豆由来の新規グレリン分泌促進ペプチド soy-ghretropin のキャラクタリゼーション**
**10:45**　○中戸絢也[1]，青木隼人[1]，岩倉　浩[2]，金本龍平[1]，大日向耕作[1]（[1]京大院・農・食品生物，[2]京大メディカルイノベーションセンター）

**2A06a07　ダイゼインは胃内容排出を遅延させ，飼料摂取量を減少させた**
**11:00**　○阿部恭大，小林拓広，藤谷美菜，岸田太郎（愛媛大院農）

**2A06a08　小腸刷子細胞に発現する遺伝子の生体内機能の検証**
**11:15**　○谷下道大[1]，成川真隆[1]，石渡賢治[2]，吉岡美紗子[1]，朝倉富子[1]，嘉糠洋陸[2]，阿部啓子[1]，石丸喜朗[1]（[1]東大院農生科，[2]慈恵医大・熱帯医学）

**2A06a09　腸内細菌脂肪酸代謝物の代謝改善作用**
**11:30**　○宮本潤基[1]，粕渕真由[1]，中島　啓[1]，米島靖記[2]，岸野重信[3]，入江潤一郎[4]，菅原達也[3]，有田　誠[5]，小川　順[3]，伊藤　裕[4]，木村郁夫[1]（[1]東京農工大学 農，[2]日東薬品工業㈱，[3]京都大学 農，[4]慶應義塾大学 医，[5]理研 IMS）

**2A06a10　Impact of chronic high fat and/or high sucrose feeding on meal-induced GLP-1 secretion**
**11:45**　○Jukkrapong PINYO，Tohru HIRA，Hiroshi HARA（Hokkaido Univ.）

## A06 会場　午後の部（14:00〜18:20）

食品―食品機能・栄養－神経，内分泌，味覚・食欲―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**2A06p01　粉末あるいは固形飼料を長期間摂取させたラットの血圧調節と視床下部遺伝子発現変動**
**14:00**　○齊藤美佳[1]，永井俊匡[1]，小川真奈[2]，石丸喜朗[2]，阿部啓子[2,3]，朝倉富子[2]（[1]高崎健大・栄養，[2]東大院農生科・応生化，[3]神奈川科学技術アカデミー）

**2A06p02　粉末あるいは固形飼料を長期間摂取させたラットの視床における発現遺伝子の比較解析**
**14:15**　○小川真奈[1]，永井俊匡[2]，齊藤美佳[2]，石丸喜朗[1]，阿部啓子[1,3]，朝倉富子[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]高崎健大・栄養，[3]神奈川科学技術アカデミー）

**2A06p03　AgRP 神経回路の活動が味覚感受性に与える影響の解析**
**14:30**　○傅　欧，岩井　優，三坂　巧，中島健一朗（東大院農生科・応生科）

**2A06p04　橋結合腕傍核の味覚応答部位からの神経の投射パターンの解析**
**14:45**　○岩井　優，傅　欧，三坂　巧，中島健一朗（東大院農生科・応生化）

**2A06p05　食刺激が離乳期のマウス大脳皮質における遺伝子発現へ及ぼす影響**
**15:00**　○河江真宏，三坂　巧，成川真隆（東大院農生科･応生化）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**2A06p06　メチオナールの旨味受容体活性化メカニズムの解明**
**15:25**　○戸田安香[1,2]，中北智哉[3]，成川真隆[1]，山下有紀[2]，中島文子[2]，三坂　巧[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]キッコーマン㈱，[3]京大院・医）

**2A06p07　甘味物質とヒト甘味受容体膜貫通領域の相互作用モデルの検討**
**15:40**　○松谷拓弥[1]，中北智哉[2]，広川貴次[3]，三坂　巧[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]京大院・医，[3]産総研）

**2A06p08　食品由来の神経分化調節活性化合物の探索**
**15:55**　○川村　緑，新井大祐，伏谷伸宏，中尾洋一（早大理工）

**2A06p09　ピセアタンノールは神経幹細胞からアストロサイトへの分化を促進する**
**16:10**　○新井大祐[1]，片岡亮佑[1]，大塚悟史[1]，川村　緑[1]，内田裕子[2]，齋　政彦[2]，伊藤建比古[2]，中尾洋一[1]（[1]早大，[2]森永製菓㈱）

**2A06p10　スピラントールによる塩味増強効果の作用機構の解明**
**16:25**　○吉田喬亮[1]，宮澤利男[2]，庄司靖隆[2]，ブルースブライアント[3]，後藤知子[1]，白川　仁[1]，駒井三千夫[1]（[1]東北大学大学院農学研究科，[2]小川香料株式会社，[3]モネル化学感覚センター）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**2A06p11　マウス味細胞と味神経間の情報伝達機構の解明**
**16:50**　○藤本典大，清水英憲，林由佳子（京都大学大学院 農学研究科 農学専攻 品質評価学分野）

**2A06p12　苦味受容体抗体による苦味感受性の増強**
**17:05**　○壇　淳[1]，金谷華帆[1]，佐藤創平[1]，水谷公彦[1]，三上文三[1]，前橋健二[2]，伊井野貴史[3]，堀江健二[3]，金　武祚[3]，林由佳子[1]（[1]京大院・農，[2]東京農大・応生科，[3]株式会社ファーマフーズ）

**2A06p13　苦味物質の反復摂取による口腔内苦味蓄積性の検討**
**17:20**　○横田光平[1]，村　絵美[1,2]，大原英之[1]，松宮健太郎[1]，松村康生[1]，林由佳子[1]（[1]京大院農，[2]サントリーグローバルイノベーションセンター）

**2A06p14　加齢に伴うマウスの味覚受容の変化**
**17:35**　○冷水里穂子，林由佳子（京大農）

**2A06p15　小型魚類メダカを用いた苦味受容機構解析系の構築**
**17:50**　○高橋　健[1]，阿部啓子[1,2]，岡田晋治[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]神奈川科学技術アカデミー）

**2A06p16　煮干製造における低温乾燥オリーブ葉処理の魚臭および苦味低減効果**
**18:05**　○松原保仁，柴崎博行（香川県産業技術センター・発酵食品研究所）

## A07 会場　午前の部（9:20〜12:00）

食品―食品機能・栄養－消化・吸収，循環・血管―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**2A07a01　海産物由来スフィンゴ脂質セラミドアミノエチルホスホン酸の食品機能性の評価**
**9:20**　○友永奈美[1]，都築　毅[2]，真鍋祐樹[1]，菅原達也[1]（[1]京大院農，[2]東北大院農）

**2A07a02　哺乳動物における緑藻由来シフォナキサンチンの代謝産物の同定**
**9:35**　○新多智明[1]，李　卓思[1]，市原美里[1]，真鍋祐樹[1]，眞岡孝至[2]，菅原達也[1]（[1]京大農，[2]生産開発研）

**2A07a03　米糠酵素処理物を用いたフェルラ酸のバイオアベイラビリティの向上と体内動態の解析**
**9:50**　○大松達也[1]，井上拓実[1]，今井裕介[1]，尼子みどり[1,2]，鈴木志保[1,2]，前田浩明[3]，北村進一[1]（[1]大阪府大院 生命環境，[2]（有）IPE，[3]㈱オリジン生化学）

**2A07a04　大麦品種 BARLEYmax の摂取がラットの盲腸および結腸の腸内発酵に及ぼす影響**
**10:05**　○青江誠一郎[1]，山中千恵美[1]，北薗英一[2]，妹脊和男[2]（[1]大妻女子大家政，[2]帝人株式会社）

**2A07a05　クエン酸による小腸からのカルシウム吸収促進作用とそのメカニズム解析**
**10:20**　○生谷隆麿[1]，齋藤弘貴[1]，瀬川修一[1]，平光正典[2]，

井上孝司[2]，青江誠一郎[3]，土屋陽一[1]（[1]サッポロホールディングス㈱ 価値創造フロンティア研究所，[2]ポッカサッポロフード＆ビバレッジ㈱ 新規基盤開発研究所，[3]大妻女子大学 家政学部 食物学科）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**2A07a06　腹部大動脈瘤の進展・破裂に及ぼす高脂肪食の影響評価**
**10:45**　◦橋本佳祐，久後裕菜，財満信宏，森山達哉（近大農院）

**2A07a07　高食塩負荷高血圧自然発症ラットにおける血管機能低下等に対する茶品種「やぶきた」「そうふう」「サンルージュ」の飲用による保護効果の比較**
**11:00**　◦物部真奈美，野村幸子，江間かおり，山本(前田)万里，根角厚司（農研機構）

**2A07a08　緑茶カテキン EGCG の血栓症予防因子 TFPI 発現促進作用とそのメカニズム**
**11:15**　◦十時繁幸，高倉卓也，上崎浩克，山下修矢，熊添基文，立花宏文（九州大学大学院 農学研究院 生命機能科学部門）

**2A07a09　マイタケによるヒト臍帯静脈内皮細胞の血管新生促進作用**
**11:30**　◦清水崇光[1]，小林　仁[1]，大内謙二[1]，都築　毅[2]（[1]ホクト，[2]東北大院農）

**2A07a10　血管内皮細胞におけるガス状シグナル物質硫化水素の特異的検出法の開発**
**11:45**　◦寺田智子[1]，宮崎　均[2]，吉田滋樹[2]（[1]筑波大院･生命環境，[2]筑波大・生命環境系）

## A07 会場　午後の部（14:00〜18:20）

食品―食品機能・栄養－消化・吸収，循環・血管―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**2A07p01　プラズマローゲン分解物や関連化合物の定量法確立と臨床サンプル測定**
**14:00**　◦乙木百合香[1]，加藤俊治[1]，マリーヘネベル[2]，アミーヤタハ[2]，ウォルタースワドフィガー[3]，宮澤陽夫[4,5]，仲川清隆[1]（[1]東北大院農・機能分子解析，[2]カリフォルニア大学･デーヴィス校，[3]トロント大学，[4]東北大・未来科学技術共同研究センター，[5]東北大院農・食の健康科学ユニット）

**2A07p02　エタノールアミン型プラズマローゲンの吸収評価：とくにコリン型への変換について**
**14:15**　◦上吉原怜奈[1]，乙木百合香[1]，伊藤隼哉[1]，加藤俊治[1]，山下慎司[2]，池田郁男[3]，宮澤陽夫[4,5]，仲川清隆[1]（[1]東北大院農・機能分子解析，[2]帯広畜産大・機能科学，[3]東北大院農・食品化学，[4]東北大・未来科学技術共同研究センター，[5]東北大院農・食の健康科学ユニット）

**2A07p03　ルテオリンの吸収動態と生理作用の評価**
**14:30**　◦早坂夏実[1]，呉　綾子[1]，加藤俊治[1]，毛利　哲[2]，津志田藤二郎[2]，宮澤陽夫[3,4]，仲川清隆[1]（[1]東北大院農・機能分子解析学，[2]宮城大食産業，[3]東北大･未来科学技術共同研究センター，[4]東北大院農・食の健康科学ユニット）

**2A07p04　外因性酸化コレステロールの体内動態の解析**
**14:45**　◦加藤慧士，中堀紘花，長田恭一（明治大農）

**2A07p05　低分子プロシアニジンを含む Oligonol の体内動態の解析**
**15:00**　◦依田浩樹，河合咲紀，林　洪太，長田恭一（明治大農）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**2A07p06　黒大豆種皮抽出物の血管内皮機能改善作用**
**15:25**　◦難波文男[1]，齋藤　静[1]，戸田登志也[1]，山下陽子[2]，芦田　均[2]（[1]フジッコ株式会社，[2]神戸大学大学院　農学研究科）

**2A07p07　黒大豆の加工によるポリフェノール含量と機能性の変化**
**15:40**　◦仲村明日賀[1]，王　柳青[1]，難波文男[2]，戸田登志也[2]，芦田　均[1]，山下陽子[1]（[1]神大農，[2]フジッコ株式会社）

**2A07p08　黒大豆の生体機能性について**
**15:55**　◦山下陽子[1]，難波文男[2]，齋藤　静[2]，戸田登志也[2]，芦田　均[1]（[1]神大院農，[2]フジッコ株式会社）

**2A07p09　ニンニク成分アリシンはカプサイシン受容体 TRPA1 を介してラット大腸起電性クロライドイオン分泌を亢進する**
**16:10**　◦土谷　庸[1]，川俣幸一[2]（[1]東北女子大健康栄養，[2]東北生活文化家政）

**2A07p10　ジアシルグリセロールキナーゼ α 活性化剤としての緑茶カテキン EGCg の経口投与による糖尿病性腎症改善効果**
**16:25**　◦林　大輝，上田修司，山之上稔，芦田　均，白井康仁（神戸大院・農・生命機能）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**2A07p11　α-シクロデキストリンで包接されたレンチオニンの安定性とその血小板凝集抑制作用**
**16:50**　◦中条早紀[1]，島田正一郎[1]，櫻井彩夏[2]，関　祐作[2]，赤尾　真[1,2]，熊谷日登美[1,2]（[1]日大院生資科，[2]日大生資科）

**2A07p12　食品由来 ACE 阻害ペプチドの相乗効果と阻害様式**
**17:05**　◦岩本しほり，山崎　遼，小山正浩，中村浩蔵（信州大農）

**2A07p13　コリンエステル類高含有食品の探索**
**17:20**　◦山口翔平，松本健督，森田恵梨，三輪優莉絵，小山正浩，中村浩蔵（信州大農）

**2A07p14　コリンエステル高含有農産物・ナスの高血圧自然発症ラットにおける抗高血圧作用**
**17:35**　◦松本健督，山口翔平，渡辺　旭，早崎大輔，小山正浩，中村浩蔵（信州大農）

**2A07p15　テレメトリー法による高血圧自然発症ラットにおける経口投与コリンエステル類の血圧上昇抑制作用評価**
**17:50**　◦高橋佑介，渡辺　旭，早崎大輔，山口翔平，小山正浩，中村浩蔵（信州大農）

**2A07p16　酒粕の抗酸化性およびアンジオテンシン変換酵素阻害活性に及ぼす精米歩合および貯蔵の影響**
**18:05**　◦谷本昌太[1]，岩佐美月[1]，大石綾乃[1]，田辺詩織[1]，近藤留未[2]，馬渕良太[1]（[1]県立広島大人間文化，[2]県立広島大院総合学術）

## A08 会場　午前の部（9:20〜12:00）

食品―食品機能・栄養－脂質代謝―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**2A08a01　食事性リン脂質の構成脂肪酸が腸管吸収過程における消化性に及ぼす影響**
**9:20**　◦室田佳恵子[1]，平野明伽音[1]，渡辺　嘉[2]，大久保剛[3]（[1]近大理工，[2]大阪市工研，[3]仙台白百合女子大）

**2A08a02　ライチ由来低分子化ポリフェノールである Oligonol の生体内コレステロールレベル低下作用の解明**
**9:35**　◦林　洪太[1]，河合咲紀[1]，三田村真里[1]，長田恭一[1]，高成　準[2]，北舘健太郎[2]（[1]明治大農，[2]アミノアップ化学）

**2A08a03　卵白タンパク質由来の新規コレステロール代謝改善ペプチド SRLY の発見**
**9:50**　◦内山裕香，坪井俊樹，島田昌也，長岡　利（岐阜大学応用生物科学部食品分子機能学研究室）

**2A08a04　ラクトスタチン(IIAEK)は肝特異的転写因子 HNF-3 α を介してコレステロール分解系を活性化する**
**10:05**　◦大林由季奈，磯貝　渚，井辰かおる，島田昌也，長岡　利（岐阜大学応用生物科学部・食品分子機能学研究室）

**2A08a05　エピガロカテキンガレート(EGCG)は 67kDa Laminin Receptor (67LR)を介さない ERK 経路でコレステロール代謝改善作用を発揮する**
**10:20**　◦岡田雄大，北村幸平，島田昌也，長岡　利（岐阜大学応用生物科学部食品分子機能学研究室）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**2A08a06　テアフラビンが胆汁酸吸収トランスポーター活性に与える影響**
**10:45**　◦石川和樹[1]，小川真奈[1]，石井剛志[2]，阿部啓子[1,3]，

小林彰子[1]（[1]東大院農，[2]神戸学院栄，[3]神奈川科学技術アカデミー）

**2A08a07　ベタイン摂取がラットの脂質代謝に及ぼす影響**

**11:00**　◦溝上拓哉[1]，　林　拓也[1]，　田中愛健[2]，　城内文吾[1]，石塚　敏[2]，名倉泰三[3]，福島道広[4]，佐藤匡央[1]（[1]九大院・農，[2]北海道大院・農，[3]日本甜菜製糖，[4]帯畜大・食品科学）

**2A08a08　胆汁酸誘導性未病状態の脱脂乳チーズによる改善作用**

**11:15**　◦高橋勇太郎[1]，　李　東根[1]，　李　娟美[1]，　趙　佳賢[1]，加茂佳恵[1]，　多田幸司[1]，　堀　将太[1]，　花井健人[1]，　竹内あかり[1]，田中愛健[1]，　清水英寿[2]，　若松純一[1]，　原　博[1]，　石塚　敏[1]，玖村朗人[1]（[1]北大農，[2]島根大生資）

**2A08a09　日本食と地中海食の健康有益性比較**

**11:30**　◦溝脇由衣[1]，　菅原沙恵子[1]，　山本和史[1]，　坂本有宇[1]，岩垣ゆい[1]，川上祐生[2]，五十嵐美樹[3]，都築　毅[1]（[1]東北大院農，[2]岡山県大，[3]理研統合生医）

**2A08a10　異なる年代の日本食の成分比較とその応用**

**11:45**　◦都築　毅[1]，　坂本有宇[1]，　菅原沙恵子[1]，　菅原達也[2]，木村和彦[3]（[1]東北大院農，[2]京大院農，[3]宮城大食産業）

## A08 会場　午後の部（14:00〜18:05）

食品―食品機能・栄養－脂質代謝―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**2A08p01　マカ摂取ラット肝臓での脂肪酸代謝に関わる遺伝子発現の変化**

**14:00**　◦宮崎麻美，緒方みさと，内山文昭（中村大院栄養）

**2A08p02　マアジをすり身素材として利用する際の水晒しの回数の違いがラットの脂質代謝に及ぼす影響**

**14:15**　◦原口　翼[1]，　土橋　葵[1]，　水田成美[1]，　青木啓武[1]，武山　藍[1]，野中知夏[1]，桑原浩一[2]，田中一成[1]（[1]長崎県大・栄養健康，[2]長崎県総合水試）

**2A08p03　緑茶葉とビワ葉を混合揉捻して製造した発酵茶葉粉末長期摂取がヒトの体脂肪に及ぼす影響**

**14:30**　◦田中一成[1]，　土橋　葵[1]，　原口　翼[1]，　水田成美[1]，青木啓武[1]，　武山　藍[1]，　野中知夏[1]，　宮田裕次[2]，　吉野　豊[3]，小森美加[4]，山村春男[5]（[1]長崎県大・栄養健康，[2]長崎県農林技セ，[3]サンダイ，[4]ケイ・エス・オー，[5]シャルレ）

**2A08p04　必須脂肪酸欠乏食による脂肪肝形成機構の検討**

**14:45**　◦中嶌岳郎[1]，　盧　郁[1]，　中村浩蔵[2]，　小山正浩[2]，杉山英子[3]，上條祐司[1]，田中直樹[1]，青山俊文[1]（[1]信大医，[2]信大農，[3]長野県短大）

**2A08p05　低アルギニン食による肝脂肪蓄積機構の解析**

**15:00**　◦赤坂優太[1]，大谷りら[1]，賈　慧娟[1]，菅原正義[2]，加藤久典[1]（[1]東大・食と生命，[2]長岡高専）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**2A08p06　調理加工が大豆食品の脂質代謝調節機能に及ぼす影響：スターチ食とスクロース食における比較**

**15:25**　◦高橋陽子，八巻幸二（農研機構食品研）

**2A08p07　イソマルトデキストリンの血中中性脂肪上昇抑制作用**

**15:40**　◦高柿了大，谷口美文，櫻井岳夫，渡辺　光，三鼓仁志，牛尾慎平，福田恵温（㈱林原　研究開発本部）

**2A08p08　麹抽出物の脂質代謝改善作用に関する研究**

**15:55**　◦高橋春弥[1]，　紀　欣儀[1]，　毛利晋輔[1]，　鎌苅浩介[1]，中田啓司[2]，　一條範好[2]，　中田理恵子[3]，　井上裕康[3]，　後藤　剛[1,4]，河田照雄[1,4]（[1]京大院農・食品生物，[2]マルコメ㈱，[3]奈良女子大・生活環境科学，[4]京大・生理化学研究ユニット）

**2A08p09　高脂肪食負荷ラットにおけるアルギン酸カルシウムの脂肪低下作用の検討**

**16:10**　◦斉藤早知[1]，　井戸田陽子[2]，　加藤多佳子[2]，　横山朱里[2]，矢野健太郎[2]，　柿沼千早[2]，　宮島千尋[1]，　笠原文善[1]，　荻原琢男[3]（[1]株式会社キミカ，[2]高崎健康福祉大学　薬学部，[3]高崎健康福祉大学大学院　薬学研究科）

**2A08p10　自然発症 2 型糖尿病モデル動物を低温環境に曝露した際の脂肪組織エネルギー代謝関連遺伝子の発現変動**

**16:25**　◦出口美輪子[1]，　生谷美紗都[1]，　仲　朋美[1]，　細田明美[2]，山岸あづみ[3]，海老原伸[1]，金　東浩[1]，佐伯　茂[1]（[1]大阪市大・院生活科学，[2]東京医療保健大・医療栄養，[3]山形大・地域教育）

**p11〜p15 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**2A08p11　分枝鎖アミノ酸摂食がラットの奇数直鎖脂肪酸および分枝鎖脂肪酸代謝に及ぼす影響**

**16:50**　◦林　拓也，城内文吾，佐藤匡央（九大農）

**2A08p12　中鎖脂肪酸・ケトン食による代謝機能改善メカニズムの分子レベルでの解明**

**17:05**　◦粕渕真由[1]，　渡辺啓太[1]，　宮本潤基[1]，　中島　啓[1]，國澤　純[2]，木村郁夫[1]（[1]東農工大農，[2]医薬基盤・健康・栄養研究所）

**2A08p13　肥満誘導慢性炎症モデルマウスにおける乳脂肪球皮膜摂取の影響**

**17:20**　◦廣瀬彰人[1]，　山田　潔[1]，　蕪山由己人[1]，　元島英雅[2]，東　徳洋[1]（[1]宇大農，[2]よつ葉乳業㈱）

**2A08p14　卵巣摘出ラットにおける共役リノール酸と糖転移ヘスペリジンの脂質代謝異常予防効果**

**17:35**　◦小栗幹也[1]，　谷澤　郁[1]，　鈴木那菜[1]，　長崎千尋[1]，遠藤　伸[2]，長田恭一[1]（[1]明大農，[2]林原）

**2A08p15　更年期脂質代謝変動に対する大豆イソフラボン精製物と共役リノール酸の併用摂取効果**

**17:50**　◦谷澤　郁[1]，　小栗幹也[1]，　吉富　簾[1]，　長田恭一[1]，戸田登志也[2]（[1]明治大農，[2]株式会社フジッコ）

## B09 会場　午前の部（9:20〜12:00）

食品―食品機能・栄養－酸化，抗酸化，糖化，抗糖化，老化―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**2B09a01　蛋白質の安定化能を持つ，低プロオキシダント性抗酸化物質の探索**

**9:20**　◦黒川洋一，　眞柄佳奈，　高見勇成，　安藤賢司，　伊佐純一（福井県大生物資源）

**2B09a02　焙煎コーヒーに発見された強力なキサンチンオキシダーゼ阻害活性物質・ピロガロールの活性発現機構研究（その 1）**

**9:35**　◦本田沙理[1]，　福山侑弥[1]，　西脇　寿[2]，　増田晃子[3]，増田俊哉[1]（[1]大阪市大院生活，[2]愛媛大院農，[3]四国大生活）

**2B09a03　リポソーム反応系での α-トコフェロールと各種抗酸化物の相乗効果に及ぼす反応時間の影響**

**9:50**　◦鈴木敦弓，古川裕美子，小林弘司，山内良子，石川洋哉（福岡女子大学）

**2B09a04　白金ナノ粒子は低濃度条件で細胞内の抗酸化機構を制御する**

**10:05**　◦石井ふらの[1]，　濱崎武記[3]，　原田額郎[3]，　樺山　繁[4]，照屋輝一郎[1,2,3]，白畑實隆[1,2,3]（[1]九大院・生資環，[2]九大院・シス生，[3]九大院・農院，[4]日本トリム）

**2B09a05　液体表面培養したカバノアナタケが生産する抗酸化物質の評価**

**10:20**　◦高柴則子，藏本彩加，米田任伸，櫻井明彦（福井大工）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**2B09a06　コエンザイム Q10/γ-シクロデキストリン包接複合体の経口摂取による健康増進効果**

**10:45**　◦上梶友記子[1]，寺尾啓二[1,2]（[1]シクロケムバイオ，[2]神戸大院医）

**2B09a07　タモギタケ中の Ergothioneine の抗酸化機序に関する研究**

**11:00**　◦坪田知佳[1]，大社勇太[2]，三谷茂樹[2]，森光康次郎[1]（[1]お茶大院・食品科学，[2]香栄興業株式会社）

**2B09a08　LC-MS/MS によるリポタンパク脂質の酸化メカニズム解析**

**11:15**　◦加藤俊治[1]，　伊藤隼哉[1]，　清水直紀[1]，　宮澤陽夫[2,3]，

仲川清隆[1]（[1]東北大院農・機能分子解析，[2]東北大・未来科学技術共同研究センター，[3]東北大院農・食の健康科学ユニット）

**2B09a09　質量分析装置を用いたイミダゾールジペプチドの定量法の確立**

**11:30**　◦垣花優希[1]，柴田貴広[2]，内田浩二[3]，居原　秀[1]（[1]大阪府大理，[2]名大生命農，[3]東大農）

**2B09a10　食品機能学によるプレニルフラボノイドの特性解明（奨励賞受賞講演）**

**11:45**　◦向井理恵　（徳島大学大学院生物資源産業学研究部）

## B09 会場　午後の部（14:00〜18:20）

食品―食品機能・栄養－酸化，抗酸化，糖化，抗糖化，老化―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**2B09p01　モリンガ葉抽出物を用いた健康長寿食品の開発【その 1】－抗炎症に対する効果**

**14:00**　◦中村唱乃，坂下真耶，堀江健二，金　武祚（㈱ファーマフーズ）

**2B09p02　モリンガ葉抽出物を用いた健康長寿食品の開発【その 2】－糖・脂質代謝に対する効果**

**14:15**　◦伊井野貴史，中村唱乃，坂下真耶，堀江健二，金　武祚（㈱ファーマフーズ）

**2B09p03　モリンガ葉抽出物を用いた健康長寿食品の開発【その 3】－肌に対する効果**

**14:30**　◦山田裕晃，中村唄乃，坂下真耶，堀江健二，金　武祚（㈱ファーマフーズ）

**2B09p04　モリンガ葉抽出物を用いた健康長寿食品の開発【その 4】－育毛に対する効果**

**14:45**　◦田中小百合[1]，林　英雄[1]，森田沙代[2]，中村紀夫[1]，坂下真耶[1]，堀江健二[1]，吉永直子[2]，森　直樹[2]，金　武祚[1]（[1]㈱ファーマフーズ，[2]京大院農・応用生命）

**2B09p05　アブラナ科伝統野菜のスプラウトの機能性について**

**15:00**　◦根古谷竜，下村講一郎（東洋大院生命）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**2B09p06　アラメ属・カジメ属褐藻類から単離したフロロタンニン類の抗糖化活性**

**15:25**　◦杉浦真悟[1,6]，南　佑弥[2]，田中礼士[1,4,6]，三宅英雄[1,4,6]，モリテツシ[3,4,6]，植田充美[5,6]，柴田敏行[1,4,6]（[1]三重大院・生資，[2]三重大・生資，[3]早稲田大・理工，[4]三重大・海藻バイオ研，[5]京都大院農・応用生命，[6]JST・CREST）

**2B09p07　マガキ抽出物は NASH モデルマウスの肝臓において脂肪肝，炎症，アポトーシス，線維化を抑制する**

**15:40**　◦布田博敏[1]，渡邉　貢[2]，岡部浩昭[1]，上甲紗愛[1]，三浦佑介[1]，恵　淑萍[1]，伊　敏[3]，濱岡直裕[4]，三木恵美子[2]，千葉仁志[1]（[1]北海道大学 大学院保健科学研究院，[2]株式会社渡辺オイスター研究所，[3]北海道大学 大学院医学研究院，[4]北海道立総合研究機構）

**2B09p08　赤タマネギ添加発芽玄米の糖尿病および認知症の発症予防の可能性**

**15:55**　◦大坪研一[1]，菅原雅通[2]，中村澄子[1]（[1]新潟薬大応用生命，[2]新潟醸造試）

**2B09p09　鶴の子柿を原料とした柿酢及び柿酢搾り粕の機能性**

**16:10**　◦上野義栄[1]，植村亮太[1]，高野慶一[2]（[1]京都府中小企業セ，[2]宇治田原むく福祉会）

**2B09p10　アーユルヴェーダ植物の放射線防護効果**

**16:25**　◦三木健輔[1,2]，高氏裕貴[1,2]，HOSSAIN Mohammad Nazir[2,4]，山内正剛[3]，鮎澤　大[1,2]，藤井道彦[1]（[1]横浜市大・生命ナノ，[2]イチバンライフ㈱，[3]放医研，[4]Primeasia Univ.）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**2B09p11　紫外線照射による皮膚障害に対するハマチ動脈球由来エラスチンペプチドの影響**

**16:50**　◦竹森久美子[1]，山本　衛[2]，須崎有亮[2]，西　真吾[2]，米谷　俊[1]（[1]近畿大 農，[2]近畿大 生物理工）

**2B09p12　カルノシンによるミトコンドリア機能増強の分子基盤**

**17:05**　◦阿部佳世子[1]，藤井　薫[1]，松本貴之[2]，片倉喜範[3]（[1]九大院・シス生，[2]日本ハム中研，[3]九大院・農院）

**2B09p13　ヒゲナガエビ頭部の有効利用と機能性**

**17:20**　◦杉山靖正，久木野千波，福山智未，吉岡涼代，山田章二，小松正治（鹿児島大・水）

**2B09p14　オートファジー誘導食品の探索とその機能性**

**17:35**　◦花山なな子[1]，小野友愛[2]，伊東秀之[3]，片倉喜範[4]（[1]九大院生資環，[2]九大院シス生，[3]岡山県大保福，[4]九大院農院）

**2B09p15　培養肝細胞と高尿酸血症マウスにおけるウロリチン A の抗高尿酸血症作用の検討**

**17:50**　◦安達真一[1]，小松　渡[2]，吉澤史昭[3,4]，矢ヶ崎一三[1]（[1]宇都宮大・バイオセ，[2]獨協医大，[3]宇都宮大・農，[4]農工大院・連農）

**2B09p16　ローヤルゼリーの長期投与は 4 系統ヘテロマウスの健康寿命を延長する**

**18:05**　◦奥村暢章[1]，戸田年彦[2]，小澤裕介[2]，渡辺憲史[2]，生田智樹[1]，立藤智基[1]，清水孝彦[2]（[1]株式会社山田養蜂場本社，[2]千葉大院医 先進加齢医学）

## B10 会場　午前の部（9:20〜12:00）

食品―食品機能・栄養－免疫，炎症，アレルギー・アレルゲン―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**2B10a01　食品アレルギー条件下における肺組織の免疫応答の解析**

**9:20**　◦高橋　輝，津田真人，細野　朗（日大生資科・食品生命）

**2B10a02　ナツメグエタノール抽出物が示す貪食活性のメカニズム解析**

**9:35**　◦平野里枝[1]，佐々木藍美[1]，恩田浩幸[2]，菅原卓也[3]，西本壮吾[1]（[1]石川県大院・生資環，[2]エスビー食品・中央研，[3]愛媛大・農）

**2B10a03　タモギタケ中 β グルカンのマクロファージ分化に対する影響**

**9:50**　◦湊健一郎，小原章裕（名城大院農）

**2B10a04　パッションフルーツ種子エタノール抽出物の IgE 産生抑制効果に関する研究**

**10:05**　◦水崎　愛[1]，西　甲介[1,2]，玉元武司[3]，菅原卓也[1,2]（[1]愛媛大院農，[2]愛媛大食品健康科学研究センター，[3]オキナワ宮古市場）

**2B10a05　柑橘成分ナリルチン（じゃばら由来）の抗アレルギー作用について**

**10:20**　◦角田　出[1]，髙瀬清美[1]，野村哲夫[2]，今野　誠[3]（[1]石巻専修大理工，[2]ネイチャーライフ株式会社，[3]株式会社　新薬リサーチセンター）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**2B10a06　チシャトウおよびその含有成分の抗アレルギー作用に関する研究**

**10:45**　◦杉本幸雄[1]，稲垣勇翔[1]，澤井　陽[1]，藤本啓太[1]，趙　秋娥[2]，我如古菜月[3]，伊東秀之[3]，林　泰資[4]（[1]岡山大薬，[2]大森ヘルスケア，[3]岡山県立大，[4]ノートルダム清心女大）

**2B10a07　フェンネル精油とその主成分であるトランス-アネトールの抗アレルギー効果**

**11:00**　◦小林優子[1]，佐藤晴美[1]，中山博登[2]，宮里博成[2]，杉本圭一郎[2]，実宝智子[1]（[1]千里金蘭大・食物栄養，[2]長岡香料・技開研）

**2B10a08　ユズ果皮抽出物摂取による食物アレルギー性下痢に対する抑制効果**

**11:15**　◦小林みさき，荒船貴史，冨山彩緒里，東　徳洋，山田　潔（宇都宮大農）

**2B10a09　マイタケとその成分エルゴステロールの抗アレルギー作用**

**11:30**　◦川井絢矢[1]，森光一朗[1]，大内謙二[1]，平澤典保[2]（[1]ホクト，[2]東北大院薬）

**2B10a10　ブラジル産レッドプロポリスの in vitro 試験による抗アレルギー作用の評価**
**11:45**　○上原沙織，森本智美，新井靖子，光井太一，成田幸夫，市原賢二（アピ㈱長良川リサーチセンター）

## B10 会場　午後の部（14:00〜18:20）

食品―食品機能・栄養－免疫，炎症，アレルギー・アレルゲン―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**2B10p01　アデノシン類によるマクロファージ炎症促進作用に対するポリフェノールの効果**
**14:00**　○額惠理香[1]，大西康太[1]，寺尾純二[2]，河合慶親[1]（[1]徳島大院，[2]甲南女子大）
**2B10p02　乾癬モデルマウスにおける赤米ポリフェノールの抗炎症効果**
**14:15**　○戸田圭祐[1]，津嘉山泉[1]，北條奈々[1]，伊東秀之[2]，我如古茉月[2]，川上祐生[2]，高橋吉孝[2]，山本(鈴木)登志子[2]([1]岡山県大院・保健福祉学・栄養，[2]岡山県大・保健福祉学・栄養）
**2B10p03　ガーリック由来有機硫黄化合物の抗炎症作用メカニズムの解明**
**14:30**　○奥江紗知子[1]，今井孝俊[1]，日吉滉平[1]，飯塚美玖[2]，横山令奈[2]，増澤(尾﨑)依[1,2]，細野　崇[1,2]，関泰一郎[1,2]（[1]日大院生資科，[2]日大生資科）
**2B10p04　キクイモ塊茎に含まれる抗炎症成分の探索**
**14:45**　○黒澤秀梧，市東佑理，光森智加，白岩雅和（茨城大学農）
**2B10p05　プロポリスエタノール抽出物の摂取は，Th17 細胞分化を抑制して実験的大腸炎を軽減する**
**15:00**　○清水祐希，鈴木卓弥（広島大院・生物圏科学）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**2B10p06　米ぬか摂取による大腸炎抑制機構の解明**
**15:25**　○田中一已[1,2]，アウワンピン[1]，冨田　勝[1,2,3]，福田真嗣[1]（[1]慶大・先端生命研，[2]慶大・環境情報，[3]慶大・院・政策・メディア）
**2B10p07　DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスに対する植物発酵エキスの効果**
**15:40**　○山本美菜[1]，松井　梓[1]，村上允唯[2]，中村泰輔[2]，渡辺敏郎[1]（[1]園田学園女大・食栄，[2]機能性食品開発研究所）
**2B10p08　カシスアントシアニンによる KK-*A*$^{y}$ マウスおよび RAW 264.7 細胞での慢性炎症抑制作用**
**15:55**　○小舘めい，西山広亮，前多隼人（弘前大農学生命）
**2B10p09　パプリカキサントフィルによる脂肪細胞での慢性炎症状態の改善作用**
**16:10**　○三上翔平[1]，西野　梓[2]，鷹羽武史[2]，眞岡孝至[3]，前多隼人[1]（[1]弘前大学，[2]江崎グリコ㈱健康科学研究所，[3](一財）生産開発科学研究所）
**2B10p10　ブタ肝臓水解物におけるアルコール性肝障害予防作用とその活性成分の単離・同定**
**16:25**　○中村圭佑[1]，植田一馬[1]，Puspo E. Giriwono[1]，白川　仁[1]，山田耕太郎[2]，櫻井英知[2]，駒井三千夫[1]（[1]東北大・院農・栄養学，[2]ゼリア新薬工業）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**2B10p11　食物アレルギーの経皮免疫療法モデルにおける作用機序の解析**
**16:50**　○森永真実子[1,2]，平出恵利華[1,2]，土井雅津代[3]，北村紀子[4]，神沼　修[4,5]，廣井隆親[4]，足立(中嶋)はるよ[1,2]，八村敏志[1,2]（[1]東大院農生科・応生化，[2]東大院農生科・食の安全研セ，[3]鳥居薬品研究所，[4]東京都医学研・花粉症プロ，[5]山梨大・総合分析実験セ）
**2B10p12　マウスを用いた卵白タンパク質の経皮感作モデル系の確立と高度化**
**17:05**　○小川昂志，高蓋秋穂，村上浩規，岩本和子，矢野えりか，財満信宏，森山達哉（近大農）
**2B10p13　ウシ生乳中リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素の精製と酵素学的性質ならびに乳房炎のバイオマーカーとしての検討**
**17:20**　○川井恵梨佳[1]，田中充樹[1]，戸田圭祐[1]，目賀拓斗[1]，川上祐生[2]，高橋吉孝[2]，木本眞順美[2]，山本登志子[2]([1]岡山県大院・保健福祉学，[2]岡山県大・保健福祉学・栄養）
**2B10p14　タンパク質ピロール化に関与する内因性低分子化合物の同定**
**17:35**　○岩田汐里[1]，廣瀬冴美[1]，日沖裕介[1]，柴田貴広[1]，内田浩二[1,2]（[1]名大院・生命農，[2]東大院・農学生命）
**2B10p15　マクロファージ様細胞によるピロール化タンパク質の取り込み**
**17:50**　○平出直哉[1]，柴田貴広[1]，内田浩二[1,2]（[1]名大院・生命農，[2]東大院・農生科）
**2B10p16　経口免疫寛容により誘導されたアナジー化 T 細胞の網羅的 DNA メチル化解析**
**18:05**　○豊田彩乃[1]，古崎利紀[2]，石井一夫[2]，服部　誠[1]，好田　正[1]（[1]東農工大，[2]東農工大・農学系ゲノム科学人材育成プログラム）

## C11 会場　午前の部（9:20〜12:00）

有機化学，天然物化学―天然物－生合成，代謝―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**2C11a01　epsilon-Poly-L-lysine 合成酵素(Pls)におけるタンデム縮合ドメインの機能解析**
**9:20**　○阿部修平[1]，吉村友宏[2]，老川典夫[1]，山中一也[1]（[1]関西大・化生工，[2]JNC・横浜研）
**2C11a02　微生物二次代謝産物生合成研究をアシストする高効率 TAR 直接クローニング法の開発**
**9:35**　○安田真央，老川典夫，山中一也（関西大・化生工）
**2C11a03　シロイヌナズナの推定ステロイド生合成酵素の機能解析**
**9:50**　○猪野琢成[1]，山岸智明[1]，小野寺桜子[2]，伊藤友里華[1]，西尾佳樹[1]，大西利幸[3]，関本　均[1,2]，横田孝雄[4]，野村崇人[1,5]（[1]宇都宮大院農，[2]宇都宮大農，[3]静岡大院農，[4]帝京大バイオ，[5]宇都宮大バイオ）
**2C11a04　An unprecedented glutamate epimerase for bacterial peptidoglycan biosynthesis**
**10:05**　○Ruoyin FENG[1]，Yasuharu Satoh[1]，Yasushi Ogasawara[1]，Tohru Yoshimura[2]，Tohru Dairi[1]（[1]Hokkaido Univ., [2]Nagoya Univ.）
**2C11a05　放線菌に見出されたペプチドリガーゼオルソログの機能解析**
**10:20**　○藤村祐子，小笠原泰志，大利　徹（北大工）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**2C11a06　ケトメミシンの生合成に関わるアミジノ基転移酵素の機能解析**
**10:45**　○小笠原泰志，藤盛道子，川田純平，大利　徹（北大工）
**2C11a07　新規メナキノン生合成経路阻害剤の探索**
**11:00**　○近藤憲介，小笠原泰志，原田立夏子，池田安由美，大利　徹（北大工）
**2C11a08　Analysis of secondary metabolites in plasmidless mutants of *Streptomyces rochei* 7434AN4**
**11:15**　○Yosi NINDITA[1]，Kuninobu INADA[2]，Haruyasu KINASHI[1]，Kenji ARAKAWA[1]（[1]Department of Molecular Biotechnology, Graduate school of AdSM, Hiroshima University, [2]N-BARD, Hiroshima University）
**2C11a09　放線菌 *Streptomyces rochei* の抗生物質生産誘導シグナル分子 SRB の生合成経路の網羅的解析**
**11:30**　○手島愛子，波多江希，津田直人，謝　麗，河原弘幸，木梨陽康，荒川賢治（広島大院・先端研）
**2C11a10　放線菌 *Streptomyces rochei* の多重変異株が生産するアゾキシアルケン化合物 KA57-A の生合成機構**
**11:45**　○岸本拓也[1]，國武博文[1]，NINDITA Yosi[1]，木梨陽康[1]，福本　敦[2]，安齊洋次郎[2]，荒川賢治[1]（[1]広島大院・先端研，[2]東邦大学・薬学部）

## C11 会場　午後の部（14:00〜18:20）

有機化学，天然物化学―天然物－生合成，代謝―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**2C11p01　Streptothricin 生合成遺伝子を利用した β-lysine oligopeptide 生産菌の構築**
**14:00**　○川崎春香，丸山千登勢，濱野吉十（福井県大生物資源）

**2C11p02　BD-12 生合成における *N*-formimidoyl 基転移酵素の酵素学的諸性質**
**14:15**　○新倉春香[1]，丸山千登勢[1]，小笠原泰志[2]，大利　徹[2]，濱野吉十[1]（[1]福井県大・生物資源，[2]北大・工）

**2C11p03　streptothricin 類縁生合成遺伝子群に見出した amino-acyl-tRNA 依存型ペプチド合成酵素の機能解析**
**14:30**　○松田貫暉[1]，丸山千登勢[1]，橋本絢子[2]，新家一男[3]，濱野吉十[1]（[1]福井県大・生物資源，[2]JBIC，[3]産総研）

**2C11p04　*O*-acyl peptide 構造を有する streptothricin 類縁化合物の生合成**
**14:45**　○丸山千登勢[1]，橋本絢子[2]，新家一男[3]，濱野吉十[1]（[1]福井県大生物資源，[2]JBIC，[3]産総研）

**2C11p05　粘液細菌抗生物質 cystothiazole A の異種発現とその生産性**
**15:00**　○山崎達志，鈴木　彰，柘植尚志，小鹿　一（名大院生命農）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**2C11p06　培養地衣菌由来の β-オルシノール系ポリケチド合成酵素遺伝子の解析**
**15:25**　○近藤博暉[1]，原光二郎[1]，川上寛子[1]，山本好和[2]，小峰正史[1]（[1]秋田県大院・生資科，[2]大阪自然史博）

**2C11p07　希少放線菌 *Lechevalieria aerocolonigenes* K10-0216 株が生産する pyrizomicin の生合成研究**
**15:40**　○木村　徹[1]，稲橋佑起[2]，高田拓和[1]，岩月正人[1,2]，塩見和朗[1,2]，高橋洋子[2]，大村　智[2]（[1]北里大学感染制御科学府，[2]北里大学北里生命科学研究所）

**2C11p08　*Trichoderma* sp. USF-2690 産生 sorbicillinol の生合成研究**
**15:55**　○寺島健仁，河上悠香，並木大輔，森岡　陽，清水寛之，加藤達也，菅谷紘一，小野瀬淳一，阿部尚樹（東農大院・食品栄養）

**2C11p09　Trichoderma 属糸状菌由来テルペン合成酵素の探索と機能解析**
**16:10**　○寺本和矢[1]，石神　健[2]，野中健一[3]，塩見和朗[3]，西山　真[1]，葛山智久[1]（[1]東大・生物工学セ，[2]東大院・応生化，[3]北里大・生命研）

**2C11p10　シクロラバンデュリル二リン酸合成酵素の結晶構造解析**
**16:25**　○小林正弥[1]，富田武郎[1]，品田哲郎[2]，西山　真[1]，葛山智久[1]（[1]東大・生物工学セ，[2]阪市大院・理）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**2C11p11　放線菌のメロテルペノイド生合成における普遍的脱アミノ化機構の解析**
**16:50**　○野口智弘，工藤　慧，西山　真，葛山智久（東大・生物工学セ）

**2C11p12　ペプチジルヌクレオシド系抗生物質 Amipurimycin の生合成に関する研究**
**17:05**　○池内秀雄[1]，白石太郎[1]，新家一男[2]，西山　真[1]，葛山智久[1]（[1]東大・生物工学セ，[2]産総研）

**2C11p13　カプラザマイシン生合成における小タンパク質を介したアシル化反応の発見**
**17:20**　○白石太郎[1]，廣　昇[1]，五十嵐雅之[2]，西山　真[1]，葛山智久[1]（[1]東大・生物工学セ，[2]微化研）

**2C11p14　*Streptomyces* sp. SpE090715-01 produces a maleimycin-like compound using amino-group carrier protein（AmCP）**
**17:35**　○Muhammad Prima PUTRA[1]，Naito KAZUHIRO[1]，Matsuda KENICHI[1]，Tomita TAKEO[1]，Shin-ya KAZUO[2]，Kuzuyama TOMOHISA[1]，Nishiyama MAKOTO[1]（[1]BRC, UTokyo，[2]The National Institute of Advanced Industrial Science and Technology（AIST））

**2C11p15　新規天然化合物 s56-p1 の特異なヒドラゾンユニットの生合成に関する研究**
**17:50**　○松田研一[1]，新家一男[2]，葛山智久[1]，西山　真[1]（[1]東大･生物工学セ，[2]産総研）

**2C11p16　Isolation of isoindolinomycin, a novel isoindolinone-derived natural product discovered via activation of cryptic gene cluster from Streptomyces.**
**18:05**　○Wei li THONG[1]，Kazuo SHIN-YA[2]，Makoto NISHIYAMA[1]，Tomohisa KUZUYAMA[1]（[1]BRC, UTokyo，[2]AIST）

## C12 会場　午前の部（9:20〜12:00）

有機化学，天然物化学―合成，反応機構―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**2C12a01　ピラノフラボノイド類の合成及び構造活性相関に関する研究**
**9:20**　○埋橋昇大[1]，川井　悟[1]，常盤野哲生[2]，吉澤結子[2]（[1]東電大理工，[2]秋田県大生資科）

**2C12a02　ジフェニルアルカンの合成及び構造活性相関に関する研究**
**9:35**　○梅田　駿[1]，川井　悟[1]，常盤野哲生[2]，吉澤結子[2]（[1]東電大理工，[2]秋田県大生資科）

**2C12a03　ピラノクマリン類の合成及び構造活性相関に関する研究**
**9:50**　○松浪悠貴[1]，川井　悟[1]，常盤野哲生[2]，吉澤結子[2]（[1]東電大理工，[2]秋田県大生資科）

**2C12a04　連続分岐した LPS/LOS の内部コア糖鎖の合成研究**
**10:05**　○成本裕文[1]，野添未来[2]，一柳　剛[2]（[1]鳥取大院農，[2]鳥取大農）

**2C12a05　LPS のコア糖鎖合成に向けた新規 Kdo 誘導体の合成**
**10:20**　○一柳　剛，野口晴佳，田中琢也，田中奈央，谷川優作（鳥取大農）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**2C12a06　脂質ラフトの一分子イメージングのための蛍光 GPI アンカープローブの合成**
**10:45**　○小西美紅[1,3]，鈴木達哉[1,3]，Pal Rita[1,3]，安藤弘宗[1,2,3]，今村彰宏[1]，石田秀治[1,2]，木曽　真[1,3]（[1]岐阜大・応用生物，[2]岐阜大・G-CHAIN，[3]京都大・iCeMS）

**2C12a07　人工糖脂質ドメインの創製**
**11:00**　○山口英利子[1]，河村奈緒子[1,3]，鈴木健一[3]，安藤弘宗[1,2,3]，今村彰宏[1]，石田秀治[1,2]，木曽　真[1,3]（[1]岐阜大・応用生物，[2]岐阜大・G-CHAIN，[3]京都大・iCeMS）

**2C12a08　グロボ系ガングリオシド蛍光プローブの合成**
**11:15**　○浅野早知[1]，山口英利子[1]，河村奈緒子[1,3]，安藤弘宗[1,2,3]，今村彰宏[1]，石田秀治[1,2]，木曽　真[1,3]（[1]岐阜大・応用生物，[2]岐阜大・G-CHAIN，[3]京都大・iCeMS）

**2C12a09　膜蛋白質の X 線結晶構造解析に向けたセレノ糖脂質の開発**
**11:30**　○福尾隼大[1]，鈴木達哉[1,3]，安藤弘宗[1,2,3]，今村彰宏[1]，石田秀治[1,2]，木曽　真[1,3]（[1]岐阜大・応用生物，[2]岐阜大・G-CHAIN，[3]京都大・iCeMS）

**2C12a10　セレノ化フコース誘導体群の合成と蛋白質 X 線結晶構造解析への応用**
**11:45**　○島袋隼平[1,3]，牧尾尚能[4]，鈴木達哉[1,3]，安藤弘宗[1,2,3]，今村彰宏[1]，石田秀治[1,3]，加藤龍一[4]，木曽　真[1,3]（[1]岐阜大・応用生物，[2]岐阜大・G-CHAIN，[3]京都大・iCeMS，[4]高エネ機構・放射光）

## C12 会場　午後の部（14:00〜18:20）

有機化学，天然物化学―合成，反応機構―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**2C12p01　グラム陰性細菌の寄生・共生現象を制御するクオラムセンシング機構に関する生物有機化学的研究（奨励賞受賞講演）**
**14:00** ○甲斐建次（大阪府立大学大学院生命環境科学研究科）

**2C12p02　可溶性担体と ODS の相互作用を利用した分子内環化ペプチドの合成**
**14:15** ○山上紗弓理，大神啓介，藤田裕子，岡田洋平，北野克和，千葉一裕（東農工大院）

**2C12p03　4'-N 修飾 azanucleoside の電気化学的合成法の開発**
**14:30** ○中野祐太，小路貴生，原谷涼奈，金　承鶴，千葉一裕（東農工大農）

**2C12p04　アルコールからのビス（アルキルアミノ）マレオニトリル化合物の合成**
**14:45** ○黒田　湧[1]，岡田　郁[1]，福田拓也[1]，野口恵一[2]，千葉一裕[1]，北野克和[1]（[1]東農工大院農，[2]東農工大院機器分析施設）

**2C12p05　炭素環構造を持つユニークな糖 bradyrhizose の合成研究**
**15:00** ○今野寛之，松島芳隆（東京農業大学・生物応用化学科）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**2C12p06　オートファジー誘導物質（+）-Epogymnolactam の合成研究**
**15:25** ○堀越敬介，尾形　健，松島芳隆（東京農業大学・生物応用化学科）

**2C12p07　Zerumbone の多様な反応性を利用した渡環反応制御による新規骨格形成**
**15:40** ○宇高芳美[1]，福島美幸[1]，河合　靖[2]，北山　隆[1]（[1]近畿大院・農・バイオ，[2]長浜バイオ大）

**2C12p08　Valerena-4,7(11)-diene およびその類縁体の合成検討**
**15:55** ○谷藤翔治[1]，金　成優[1]，種田圭悟[2]，伊豆友香子[1]，白井貴士[1]，妻形博紀[1]，宇高芳美[1]，北山　隆[1]（[1]近畿大院・農・バイオ，[2]近畿大・農・バイオ）

**2C12p09　イソスジエビ *Palaemon pacificus* のインスリン様ペプチドの化学合成**
**16:10** ○片山秀和[1]，向中野貴史[1]，小暮純也[2]，大平　剛[2,3]（[1]東海大工・生命化学，[2]神奈川大院理・理学，[3]神奈川大理・生物）

**2C12p10　2,3-環状保護糖供与体を用いた 1,2-*trans*-選択的グリコシド化の検討**
**16:25** ○八神なほ子[1,3]，小西美紅[1,3]，玉井秀樹[1,3]，植木章晴[1,3]，今村彰宏[1]，安藤弘宗[1,2,3]，石田秀治[1,2]，木曽　真[1,3]（[1]岐阜大・応用生物，[2]岐阜大・G-CHAIN，[3]京都大・iCeMS）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**2C12p11　5 位 Ureido 型シアル酸供与体の開発とシアロ糖鎖合成への展開**
**16:50** ○棚瀬舞子[1]，今村彰宏[1]，安藤弘宗[1,2,3]，石田秀治[1,2]，木曽　真[1,3]（[1]岐阜大・応用生物，[2]岐阜大・G-CHAIN，[3]京都大・iCeMS）

**2C12p12　特異なシアル酸配列を有するガングリオシド SJG-2 の全合成研究**
**17:05** ○真野寛之[1]，大山龍太郎[1]，坂本紘一[1]，安藤弘宗[1,2,3]，今村彰宏[1]，石田秀治[1,2]，木曽　真[1,3]（[1]岐阜大・応用生物，[2]岐阜大・G-CHAIN，[3]京都大・iCeMS）

**2C12p13　シアル酸多量体の合成研究**
**17:20** ○白崎淳哉[1]，小西美紅[1,3]，廣瀬裕哉[1]，安藤弘宗[1,2,3]，今村彰宏[1]，石田秀治[1,2]，木曾　真[1,3]（[1]岐阜大・応用生物，[2]岐阜大・G-CHAIN，[3]京都大・iCeMS）

**2C12p14　AE3 determinant 糖鎖の化学合成**
**17:35** ○河合一憲[1]，今村彰宏[1]，安藤弘宗[1,2,3]，石田秀治[1,2]，木曽　真[1,3]（[1]岐阜大・応用生物，[2]岐阜大・G-CHAIN，[3]京都大・iCeMS）

**2C12p15　自己免疫疾患関連リポオリゴ糖鎖の化学合成**
**17:50** ○吉仲宏揮[1]，今村彰宏[1]，安藤弘宗[1,2,3]，石田秀治[1,2]，木曽　真[1,3]（[1]岐阜大・応用生物，[2]岐阜大・G-CHAIN，[3]京都大・iCeMS）

**2C12p16　Self-condensation 戦略によるポリラクトサミン化学合成法の開発**
**18:05** ○浅野拓也[1]，今村彰宏[1]，安藤弘宗[1,2,3]，石田秀治[1,2]，木曽　真[1,3]（[1]岐阜大・応用生物，[2]岐阜大・G-CHAIN，[3]京都大・iCeMS）

## C13 会場　午前の部（9:20〜11:45）

有機化学，天然物化学―天然物－単離構造決定－植物―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**2C13a01　昆虫による食害でリンゴ果実に誘導される化合物群の分析と同定**
**9:20** ○鐵本夕貴[1]，吉永直子[1]，石栗陽一[2]，森　直樹[1]（[1]京大農，[2]青森産技セ りんご研）

**2C13a02　モモシンクイガ雌成虫触角に対する炭酸カルシウム水和剤の化学的効果**
**9:35** ○風間春奈[1]，手嶋　伸[1]，田中真史[1]，吉永直子[1]，高梨琢磨[2]，所　雅彦[2]，石栗陽一[3]，森　直樹[1]（[1]京大農，[2]森林総研，[3]青森産技セ りんご研）

**2C13a03　ダイズさび病菌に対する抵抗性ダイズ品種の化学的応答**
**9:50** ○中田　隆[1]，竪石秀明[2]，永塚隆由[2]，吉永直子[1]，小野　肇[1]，Eric Schmelz[3]，寺石政義[4]，奥本　裕[4]，森　直樹[1]（[1]京大院農・応用生命，[2]株式会社クレハ農薬研究所，[3]カリフォルニア大学サンディエゴ校，[4]京大院農・農）

**2C13a04　ウメの葯の蛍光とミツバチの訪花行動への影響**
**10:05** ○森信之介[1]，川上真理[1]，大石雅典[1]，福井宏至[2]，後藤勝実[3]，月岡淳子[3]，佐久間正幸[1]，中西テツ[4]，渡辺正夫[5]，平井伸博[1]（[1]京都大院農，[2]香川大名誉教授，[3]京都薬科大附属薬用植物園，[4]神戸大名誉教授，[5]東北大院生命）

**2C13a05　キク科植物が生産する新奇ストリゴラクトンの探索**
**10:20** ○松下明真[1]，松田一彦[2]，野村崇人[1]，米山弘一[1]，謝　肖男[1]（[1]宇都宮大学 農学部，[2]近畿大学 農学部）

**a06〜a09 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**2C13a06　Chemical investigation of methyl jasmonate-inducible sesquiterpenes from immature seeds of wild *Daucus carota* distributed throughout Sapporo area**
**10:45** ○Meijuan Lin, Motoi Yokota, Yasuyuki Hashidoko（Hokkaido University）

**2C13a07　イネ葉身に形成されるアモルファスシリカの形態による構造比較**
**11:00** ○小瀬義樹[1]，尾崎紀昭[2]，三輪京子[1]，川野　潤[3]（[1]北大・院環境，[2]秋田県大・生物資源，[3]北大・院理）

**2C13a08　イネ葉身のケイ酸体に含まれる有機物の同定**
**11:15** ○石田拓也[1]，鈴木道生[2]，常盤野哲生[1]，吉澤結子[1]，尾崎紀昭[1]（[1]秋田県大生資科，[2]東大院農生科）

**2C13a09　改造分取セルを用いた HPLC 定量分析法の開発**
**11:30** ○松本恵実，石野暢好，藤野和孝，牧岡富広，中塚進一（長良サイエンス㈱）

## C13 会場　午後の部（14:00〜18:20）

有機化学，天然物化学―天然物－単離構造決定－植物―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**2C13p01　Caco-2 細胞をモデルとした消化管 α- グルコシダーゼ量の測定と発現抑制素材の探索**
**14:00** ○野田耕太[1]，加藤英介[2]，川端　潤[2]（[1]北大農，[2]北大院農）

**2C13p02　マリアアザミ（*Silybum marianum*）に含まれる α-アミ**

奨励賞受賞講演

ラーゼ阻害物質の探索
**14:15** ○櫛引夏花[1]，加藤英介[1]，佐藤浩志[2]，川端　潤[1]（[1]北大院農，[2]日生バイオ株式会社）

**2C13p03　ゴーヤ由来ククルビタン型トリテルペン類の GLP-1 分泌促進活性**
**14:30** ○堀川　学[1]，　東　鋭明[1]，　鈴木寿栄[2]，　渡辺斉志[2]，阿部圭一[2]，島本啓子[1]，加部泰明[3]，入江潤一郎[3]（[1]サントリー生命科学財団・生有研，[2]サントリーグローバルイノベーションセンター㈱，[3]慶応義塾大医）

**2C13p04　ユーカリからのジペプチジルペプチダーゼ IV 阻害物質の探索**
**14:45** ○川上和宏[1]，加藤英介[2]，川端　潤[2]（[1]北大農，[2]北大院農）

**2C13p05　*Brucea javanica* 果実中のクアシノイド類は 3T3-L1 脂肪細胞の脂肪分解を促進する**
**15:00** ○加藤英介，　廣澤亮太，　ルーシーラーリタ，　川端　潤（北大院農）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**2C13p06　モロヘイヤの葉に含まれる抗酸化物質の探索**
**15:25** ○近田賢治，河瀬強志，勝崎裕隆（三重大 生資）

**2C13p07　延命草（Isodon trichocarpus, 地上部）含有ジテルペノイド成分のメラニン産生抑制活性**
**15:40** ○加藤和寛[1]，　萬瀬貴昭[1,2]，　二宮清文[1]，　今川貴仁[1]，松本　拓[1]，岡崎　茜[1]，岡田枝里子[1,2]，要　欣志[2]，中村　翔[2]，森川敏生[1]（[1]近畿大・薬総研，[2]株式会社　加美乃素本舗）

**2C13p08　蓮花（*Nelumbo nucifera*，花部）含有メラニン産生抑制アルカロイド成分を指標とした品質評価**
**15:55** ○奥川修平[1,2]，　北川仁一朗[1,2]，　甕　千明[1,2]，　田邉元三[3]，亀井惟頼[1]，二宮清文[1]，吉川雅之[1]，村岡　修[1,3]，森川敏生[1]（[1]近畿大・薬総研，[2]小城製薬㈱，[3]近畿大・薬）

**2C13p09　タイ天然薬物 *Mammea siamensis* 花部のアロマターゼ阻害活性**
**16:10** ○柴谷華苗[1]，　二宮清文[1]，　田邉元三[2]，　筒井　望[2]，チャイペックサワニ[1,3]，　ポンピリヤダチャユタナ[3]，　村岡　修[1,2]，森川敏生[1]（[1]近畿大・薬総研，[2]近畿大・薬，[3]ラジャマンガラ工科大）

**2C13p10　タイ天然薬物 *Melodorum fruticosum* 由来成分の NO 産生抑制活性および含有 butenolide 類の全合成**
**16:25** ○安藤恵里[1]，　萬瀬貴昭[1]，　田邉元三[2]，　福田梨沙[2]，福田友紀[2]，　筒井　望[2]，　三宅史織[3]，　中屋友紀子[3]，　山添晶子[3]，松本朋子[3]，　松田久司[3]，二宮清文[1]，村岡　修[1,2]，森川敏生[1]（[1]近畿大・薬総研，[2]近畿大・薬，[3]京都薬大）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**2C13p11　ハマアザミ（*Cirsium maritimum* Makino）の抗アレルギー活性とその活性物質**
**16:50** ○鈴木大進[1]，田中　守[2]，岡本威明[3]，渡邊浩幸[2]（[1]高知県工業技術センター，[2]高知県立大学，[3]愛媛大学）

**2C13p12　アズキ種皮に含まれる紫色色素の構造と発色機構**
**17:05** ○永井伸和[1]，　市川由樹[1]，　尾山公一[2]，　近藤忠雄[1]，吉田久美[1]（[1]名大院・情報科学，[2]名大物国セ）

**2C13p13　Oligonol®の構成成分の単離・同定とその生理活性**
**17:20** ○片山明香[1]，　柏木丈拡[1]，　島村智子[1]，　高橋麻起子[2]，中東　淳[2]，受田浩之[1]（[1]高知大農，[2]㈱アミノアップ化学）

**2C13p14　LC-MS-MS を用いたパッションフルーツ種子中のフェノール性化合物の分析**
**17:35** ○大久保絢夏[1]，　梅原将洋[1]，　野中詩織[1]，　柳江高次[1]，古屋俊樹[2,3]，木野邦器[2]，齋　政彦[1]（[1]森永製菓㈱，[2]早大理工・応化，[3]東理大理工）

**2C13p15　ラズベリー`ヒンボートップ'種のポリフェノール類分析と機能性評価研究**
**17:50** ○小堀　亮[1]，　八上修一[2]，　西村拓哉[1]，　道下　僚[1]，奥井志穂[1]，重金大貴[1]，川崎　崇[3]，齊藤安貴子[1,2]（[1]大阪電通大工・環境，[2]大阪電通大院工・先端，[3]立命館大・薬）

**2C13p16　アカマツ（*Pinus densiflora*）根からの抗マラリア活性を有する新規トリテルペノイド**
**18:05** ○大高潤之介[1]，　小松雅史[2]，　宮崎安将[2]，　二村友史[1]，長田裕之[1]（[1]理研 CSRS，[2]森林総研）

## C14 会場　午前の部（9:20〜12:00）

有機化学，天然物化学―天然物－ケミカルバイオロジー，作用機構―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**2C14a01　線虫 *C. e.elegans* の筋肉型および神経型ニコチン性アセチルコリン受容体に対する Paraherquamide A の阻害活性発現機構**
**9:20** ○伊原　誠[1]，　小鑓亮平[1]，　古谷章悟[1]，　甲斐建次[2]，林　英夫[2]，David B. SATTELLE[3]，松田一彦[1]（[1]近畿大農，[2]阪府大生環科，[3]UCL）

**2C14a02　昆虫抑制性グルタミン酸受容体活性化作用に関する okaramine 類の構造活性相関**
**9:35** ○野口　晃[1]，　古谷章悟[1]，　伊原　誠[1]，　甲斐建次[2]，林　英雄[2]，　大髙潤之介[3]，　衣笠清美[3]，　加藤直樹[3]，　高橋俊二[3]，長田裕之[3]，松田一彦[1]（[1]近大農，[2]阪府大生環科，[3]理研 CSRS）

**2C14a03　ライム病を媒介するシカダニ（*Ixodes scapularis*）の抑制性グルタミン酸受容体のアゴニストおよびアンタゴニストプロフィールと okaramine 類の活性発現機構**
**9:50** ○古谷章悟[1]，　伊原　誠[1]，　甲斐建次[2]，　林　英雄[2]，Kristin Lees[3]，　Freddie A. Partridge[3]，　Steven Buckingham[3]，David B. Sattelle[3]，松田一彦[1]（[1]近大農，[2]阪府大生環科，[3]University College London）

**2C14a04　真菌マンナンのオリゴ糖モチーフに対するプラディミシンの結合活性**
**10:05** ○山地史哉[1]，　中川　優[1,2]，　渡邉泰典[1]，　五十嵐康弘[3]，伊藤幸成[2]，小鹿　一[1]（[1]名大院･生命農，[2]理研，[3]富山県大･生工）

**2C14a05　プラディミシン A とマンノトリオースとの結合様式の解析**
**10:20** ○渡邉泰典[1]，　中川　優[1,2]，　山地史哉[1]，　土井崇嗣[3]，竹腰清乃理[3]，五十嵐康弘[4]，伊藤幸成[2]，小鹿　一[1]（[1]名大院・生命農，[2]理研，[3]京大院・理，[4]富山県大・生工）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**2C14a06　糖鎖を蛍光染色するプラディミシン誘導体の開発**
**10:45** ○都築麗江[1]，　中川　優[1,2]，　戸村友彦[1]，　五十嵐康弘[3]，伊藤幸成[2]，小鹿　一[1]（[1]名大院･生命農，[2]理研，[3]富山県大･生工）

**2C14a07　希少アルドヘキソースのがん細胞増殖抑制活性の評価**
**11:00** ○竹本和音[1]，柳田　亮[2]，佐藤正資[2]，川浪康弘[2]（[1]香大院農，[2]香大農）

**2C14a08　がん細胞増殖抑制活性を示す D-allose-6-phosphate 誘導体の作用機構の解析**
**11:15** ○石山大展[1]，柳田　亮[2]，杉山康憲[2]，川浪康弘[2]（[1]香大院農，[2]香大農）

**2C14a09　アミロイド β 凝集体に特異的に結合するクルクミン様物質の開発**
**11:30** ○今野博行，二階堂由莉，佐藤多記（山形大院理工）

**2C14a10　植物由来カフェ酸誘導体のアミロイド β 凝集阻害活性**
**11:45** ○繁森英幸[1]，　木立恵利[2]，　栗栖真奈美[2]，　宮前友策[1]，花木瑞穂[3]，村上一馬[3]，入江一浩[3]（[1]筑波大生命環境，[2]筑波大院生命環境，[3]京大院農）

## C14 会場　午後の部（14:15〜18:20）

有機化学，天然物化学―天然物－ケミカルバイオロジー，作用機構―

**p02〜p05 発表者の接続時間 14:05〜14:15**

**2C14p02　in vivo イメージングに適した水溶性向上型新規ルシフェリンアナログの開発**
**14:15** ○鉢呂佳史[1]，　齊藤亮平[1]，　木山正啓[1]，　北田昇雄[1]，盛満　玲[1]，小畠りか[2]，丹羽治樹[3]，牧昌次郎[1]（[1]電通大，[2]慶大，[3]脳科学ライフサポート研究センター）

**2C14p03　ベラトリジンによる電位依存性ナトリウムチャネルの不活性化遅延作用に対するクランベシン B 類縁体の抑制効果**
**14:30**　◦塚本匡顕[1]，　千葉雪絵[1]，　中崎敦夫[2]，　石川裕生[2]，中根嘉祈[2]，長由扶子[1]，山下まり[1]，西川俊夫[2]，此木敬一[1]（[1]東北大農，[2]名大農）

**2C14p04　低分子生理活性化合物の新規な標的タンパク質同定法の開発**
**14:45**　◦穴吹友亮，塚原美宙，松浦英幸，高橋公咲（北大院農）

**2C14p05　ゲノムワイド CRISPR/Cas9 ノックアウトライブラリーを用いた細胞毒性耐性遺伝子スクリーニングの試み**
**15:00**　◦小泉幸央[1]，　福島　淳[2]，　夏井美幸[1]，　門脇歩美[1]，山口智和[1]，今井由美子[1]，久場敬司[1]（[1]秋田大院医，[2]秋田県大生資科）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**2C14p06　アリインをモチーフとしたタンパク質修飾試薬の開発とその修飾機構の解明**
**15:25**　◦武元　円[1]，谷本　夏[2]，袴田　航[1,2]，平野貴子[2]，西尾俊幸[1,2]（[1]日大院生資科，[2]日大生資科）

**2C14p07　抗腫瘍活性物質 vicenistatin 耐性に関与する遺伝子の同定**
**15:40**　◦工藤　駿[1]，　知念拓実[1]，　兼崎　友[2]，　笠原浩司[2]，工藤史貴[3]，江口　正[3]，臼井健郎[1]（[1]筑波大生命環境科学，[2]東京農業大応用生物科学，[3]東京工業大理学院）

**2C14p08　MA026 によるタイトジャンクション開口作用機構解析**
**15:55**　◦山崎洋平[1]，　神田祐輔[1]，　志村聡美[2]，　紙透伸治[2]，菅原二三男[2]，南雲陽子[1]，臼井健郎[1]（[1]筑波大生命環境科学，[2]東京理科大理工学）

**2C14p09　化合物アレイの新たな活用法：天然物の鏡像体化合物群の活用を目指したスクリーニング法の開発**
**16:10**　◦近藤恭光[1]，　野口太朗[2]，　大石真也[2]，　本田香織[1]，大野浩章[2]，藤井信孝[2]，長田裕之[1]（[1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー，[2]京大院薬）

**2C14p10　RK460 を基盤とした ABA 受容体選択的アンタゴニストの開発**
**16:25**　◦由田和津子[1]，　三瓶　悠[2,4]，　平井　剛[2,3]，　伊藤卓也[1]，近藤恭光[1]，　清水　猛[1]，　長澤和夫[4]，　袖岡幹子[2,3]，　長田裕之[1]（[1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー，[2]理研 CSRS・有機合成，[3]理研 CSRS・触媒融合，[4]東農工大院・工）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**2C14p11　形態変化スクリーニングによる新規抗真菌物質の探索**
**16:50**　◦山本甲斐，二村友史，長田裕之（理研 CSRS・ケミカルバイオロジー研究グループ）

**2C14p12　新規トレハロース誘導体“トレハンジェリン A”は Sirt1 活性化を介しオートファジーを誘導する**
**17:05**　◦小坂邦男[1]，　曽田匡洋[1]，　田中麻美[1]，　中島琢自[2]，稲橋佑起[2]，高橋洋子[2]，大村　智[2]（[1]長瀬産業㈱，[2]北里大学北里生命科学研究所）

**2C14p13　shRNA スクリーニング法の改良による化合物の標的経路の同定の効率化**
**17:20**　◦高瀬翔平[1,2]，　黒川留美[3]，　新井大祐[4]，　中尾洋一[4]，久城哲夫[2]，松本　健[1,3,5]，吉田　稔[1,3,5]（[1]理研 CSRS・ケミカルゲノミクス，[2]明治大院・農，[3]理研・化学遺伝学，[4]早稲田大院・先進理工，[5]理研 CSRS・創薬シード）

**2C14p14　ChemProteoBase を用いた MTH1 阻害剤の作用解析**
**17:35**　◦室井　誠，川谷　誠，河村達郎，近藤恭光，二村友史，田中美帆，青野晴美，本田香織，長田裕之（理研 CSRS・ケミカルバイオロジー）

**2C14p15　耐熱性放線菌の熱ショックによる微生物ホルモン生産誘導**
**17:50**　◦齋藤　駿[1]，　加藤　航[1]，　勝山陽平[2]，　大西康夫[2]，井本正哉[1]（[1]慶大院・理工，[2]東大院・農生科）

**2C14p16　耐熱性放線菌の熱ショック代謝物(HSM)の生産**
**18:05**　◦加藤　航，齋藤　駿，井本正哉（慶應大理工）

## C15 会場　午前の部（9:20〜12:00）

有機化学，天然物化学―合成，反応機構―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**2C15a01　パラセントロンの全合成研究：アレン結合を有するエンドグループの合成**
**9:20**　◦兼山大輝，　藤丸和美，　濱田昌弘，　岸本崇生，　中島範行（富山県大工）

**2C15a02　Application of hydroxynitrile lyase from millipede in asymmetric Henry reaction**
**9:35**　◦Daijun Zheng，Yasuhisa Asano（Toyama. Pref. Univ）

**2C15a03　StrophasterolA 及び B の全合成研究－その 1**
**9:50**　◦福田裕紀，佐藤俊太郎，小倉由資，桑原重文（東北大院農）

**2C15a04　StrophasterolA 及び B の全合成研究－その 2**
**10:05**　◦佐藤俊太郎，福田裕紀，小倉由資，桑原重文（東北大農）

**2C15a05　パシロサルシン B および C の合成**
**10:20**　◦倉沢一輝，桑原重文，榎本　賢（東北大農）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**2C15a06　Aurachin 類の合成研究**
**10:45**　◦高橋和暉，桑原重文，榎本　賢（東北大農）

**2C15a07　好熱性細菌が生産する ktedonoketone 光学活性体の合成研究**
**11:00**　◦石井紗也加，桑原重文，榎本　賢（東北大農）

**2C15a08　asporyzin C の全合成研究**
**11:15**　◦室川哲郎，榎本　賢，小倉由資，桑原重文（東北大院農）

**2C15a09　Sacrolide A の全合成**
**11:30**　◦毛利朋世，十和田諒，小倉由資，桑原重文（東北大農）

**2C15a10　(2 *S*,3 *R*,4 *R*)-3,4-dihydroxyarginine の合成と一酸化窒素合成酵素の阻害活性**
**11:45**　◦増田裕一[1,2]，　丸山千登勢[3]，　川畑球一[3]，　濱野吉十[3]，土井隆行[2]（[1]三重大生物資源，[2]東北大薬，[3]福井県大生物資源）

## C15 会場　午後の部（14:00〜18:05）

有機化学，天然物化学―その他―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**2C15p01　トウモロコシ（*Zea mays*）に対するビール酵母由来の多糖による根の生育促進活性**
**14:00**　◦廣實康博[1]，　中道貴也[1]，　吉永直子[1]，　北川隆徳[2]，高崎智子[2]，　御影佳孝[2]，　新開茂樹[3]，　小林　優[1]，　宮下正弘[1]，森　直樹[1]（[1]京大院農，[2]アサヒグループホールディングス株式会社，[3]東果大阪株式会社）

**2C15p02　植物病原菌に対するイネフィトアレキシンの抗菌活性**
**14:15**　◦勝間田駿，大橋佳奈，戸嶋浩明，長谷川守文（茨城大農）

**2C15p03　海藻由来の抗菌・抗真菌物質の探索**
**14:30**　◦新毛実結，山本　歩，金子賢介（八戸高専）

**2C15p04　抗真菌性シクロデプシペプチド，W493 A の全合成**
**14:45**　◦三井美彩，太田裕太郎，附田裕也，高森啓介，二瓶賢一（宇都宮大農）

**2C15p05　クモ毒にひそむチロシナーゼ阻害活性の化学的アプローチによる探索**
**15:00**　◦舞木鏡徳，小木万里子，二瓶賢一（宇都宮大農）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**2C15p06　高親水性ウロリチン類の化学合成研究**
**15:25**　◦張間紗希[1]，小松　渡[2]，矢ヶ崎一三[3]，二瓶賢一[1]（[1]宇都宮大農，[2]獨協医大，[3]宇都宮大バイオ）

**2C15p07　親水性に優れるチロシナーゼ阻害剤，ジヒドロオキシレスベラトロール配糖体の分子デザイン**

**15:40** ○田中優理，鈴木茉莉那，小太刀悠佳，二瓶賢一（宇都宮大農）

**2C15p08　シロイヌナズナ由来糖転移酵素 UGT78D2 を用いたフラバン-3-オール誘導体の配糖体合成研究**

**15:55** ○西村拓哉[1]，柴﨑　亨[2]，濱田義知[2]，小堀　亮[1]，西野祐樹[1]，川崎　崇[3]，齊藤安貴子[1,2]（[1]大阪電通大工・環境，[2]大阪電通大院工・先端，[3]立命館大・薬）

**2C15p09　サトウダニ *Carpoglyphus lactis* における脂肪族アルデヒドを基質とする炭化水素生合成酵素の探索**

**16:10** ○森山太介[1]，森　直樹[2]，桑原保正[3,4]，清水伸泰[1]（[1]京都学園大院バイオ環境，[2]京大院農・応用生命，[3]富山大工・生工研セ，[4]JST, ERATO）

**2C15p10　新規アレン型 zerumbone の合成と多様な反応性検討**

**16:25** ○北村優斗，巽　大明，亀尾昌樹，宇高芳美，北山　隆（近畿大院・農・バイオ）

**p11〜p15 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**2C15p11　植物の気孔密度を制御するペプチドホルモン stomagen の構造活性相関**

**16:50** ○植田健太，根岸佑香里，近藤竜彦，小鹿　一（名大院・生命農）

**2C15p12　疫病菌交配ホルモンの生産プロファイルの多様性**

**17:05** ○戸村友彦，大西裕貴，小鹿　一（名大院生命農）

**2C15p13　糖鎖結合性天然物の探索に向けたオリゴ糖固定磁気ビーズの合成と評価**

**17:20** ○宮西　航，中川　優，小鹿　一（名大院・生命農）

**2C15p14　新規低毒性 X 線応答物質の探索**

**17:35** ○外山実千留[1]，森　崇[1]，高橋淳子[2]，岩橋　均[1]（[1]岐阜大応用生物，[2]産総研）

**2C15p15　Cytokinine Oxidase/Dehydrogenase の蛍光分光法による活性測定法の開発**

**17:50** ○飯野誠之，黒沼亜希子，杉山民二（明治大院農）

## C17 会場　午前の部（9:20〜12:00）

微生物―細胞－情報伝達，細胞応答，ストレス応答―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**2C17a01　二成分制御系阻害剤・ハロトリエン酸の合成検討**

**9:20** ○金　成優，北山　隆（近畿大院・農・バイオ）

**2C17a02　枯草菌二成分制御系 WalRK の熱ストレス応答と生育必須性に関する解析**

**9:35** ○高田　啓[1,2]，植田修平[3]，志波　優[1]，渡辺　智[2]，千葉櫻拓[2]，内海龍太郎[3]，吉川博文[2]（[1]立教大・生命理，[2]東京農大・バイオ，[3]近畿大・バイオ）

**2C17a03　SigI と WalKR による枯草菌の増殖維持の制御ネットワークの解析**

**9:50** ○朝井　計[1]，清水葉子[1]，廣澤早香[1]，高田　啓[2,3]，吉川博文[3]（[1]埼玉大理工，[2]立教大理，[3]東京農大応生科）

**2C17a04　Toxin-Antitoxin 相互作用阻害剤の探索**

**10:05** ○江川広紀[1]，山口良弘[2]，五十嵐雅之[3]，内海龍太郎[1]（[1]近大院農，[2]大阪市大，[3]微化研）

**2C17a05　ヒスチジンキナーゼ阻害剤 waldiomycin の細菌細胞内での作用機構**

**10:20** ○長尾勇希[1]，村井春香[1]，清水莉子[1]，植田修平[1]，岡島俊英[2]，五十嵐雅之[3]，江口陽子[4]，内海龍太郎[1]（[1]近畿大農，[2]大阪大産業科学，[3]微化研，[4]近畿大生物理工）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**2C17a06　大腸菌の熱耐性における TA システムの機能の解明**

**10:45** ○益田時光[1]，ファンミンドク[2]，二石彩映[2]，中山　文[1]，本城賢一[1]，宮本敬久[1]（[1]九大農，[2]九大院生資環）

**2C17a07　YjjJ および HipAB toxin-antitoxin system を介した persister 形成機構の解明**

**11:00** ○前田有紀[1]，成谷宏文[2]，山口良弘[1,3]（[1]阪市大院理，[2]広島大院生物，[3]阪市大複合先端研）

**2C17a08　浸透圧ストレスで誘導される大腸菌のフロック形成機構の解析**

**11:15** ○菅原慶太[1]，早坂俊亮[1]，浜本　晋[1]，井原邦夫[2]，斎藤浩美[3]，小林　弘[4]，魚住信之[1]（[1]東北大院工，[2]名大遺伝子実験施設，[3]帝京平成大院薬，[4]千葉大院薬）

**2C17a09　高浸透圧条件下における大腸菌機械受容チャネル YbdG の C 末端領域の機能解析**

**11:30** ○雨宮　駿[1]，豊田隼斗[1]，浜本　晋[1]，鎌形清人[2]，古田忠臣[3]，井原邦夫[4]，斎藤浩美[5]，小林　弘[6]，魚住信之[1]（[1]東北大院・工，[2]東北大院・多元研，[3]東工大・生命理工，[4]名大・遺伝子実験施設，[5]帝京平成大・薬，[6]千葉大院・薬研）

**2C17a10　大腸菌ペリプラズムタンパク質 YccT によるアミロイド線維形成抑制機構の解明**

**11:45** ○小笠原寛[2,3]，佐野晃太郎[1]，加藤佑輝[1]（[1]信州大･院理工･応生，[2]信州大・基盤研究支援セ・遺伝子，[3]信州大・菌類・微生物ダイナミズム創発研究セ）

## C17 会場　午後の部（14:00〜18:20）

微生物―細胞－情報伝達，細胞応答，ストレス応答―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**2C17p01　*Paracoccus denitrificans* における細胞間コミュニケーションを介した凝集体形成抑制メカニズムの解明**

**14:00** ○森永花菜，豊福雅典，尾花　望，野村暢彦（筑波大生命環境）

**2C17p02　多様な AHL の応答に関与するセンサーキナーゼの同定とクオラムセンシングへの影響**

**14:15** ○島村裕子[1]，豊福雅典[1]，諸星知広[2]，池田　宰[2]，野村暢彦[1]（[1]筑波大・院生命環境，[2]宇都宮大・院工）

**2C17p03　緑膿菌自然環境単離株における微生物間コミュニケーション機構の多様性**

**14:30** ○遠矢正城[1]，豊福雅典[1]，木暮一啓[2]，野村暢彦[1]（[1]筑波大院・生命環境，[2]東大・大気海洋研）

**2C17p04　伸縮機能性高分子を用いた新規微生物制御法の開発**

**14:45** ○勝亦雄太，豊福雅典，UTADA Andrew S.，小川和義，野村暢彦（筑波大院　生命環境系）

**2C17p05　バイオフィルム内部における自然突然変異株出現機構の解析**

**15:00** ○伊澤　徹[1]，豊福雅典[2]，清川達則[3]，楊　佳約[3]，尾花　望[2]，野村暢彦[2]（[1]筑波大生命環境，[2]筑波大生命環境系，[3]筑波大院生命環境科学）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**2C17p06　Clostridiales 目細菌ゲノムにコードされる *agr* 様クオラムセンシング系自己誘導ペプチドの LC-MS/MS 検出系の確立**

**15:25** ○中山二郎[1]，神川美樹[1]，安達桂香[1]，大久保謙一[1]，大谷　郁[2]，岡健太郎[2]，園元謙二[1]（[1]九大院農，[2]ミヤリサン製薬）

**2C17p07　*Clostridium perfringens* の内在性クオラムクエンチング―代謝同調的 pH 低下によるクオラムセンシング機構の抑制―**

**15:40** ○安達桂香[1]，神川美樹[1]，Ravindra Pal Singh[1]，大谷　郁[2]，園元謙二[1]，中山二郎[1]（[1]九大院・農，[2]ミヤリサン製薬）

**2C17p08　細菌の情報伝達レギュロン・メンバー間でのシグナル依存的エピスタティック相互作用**

**15:55** ○加藤明宣，東野奈美，内海龍太郎（近大農）

**2C17p09　病原菌エフェクターの膜局在化に依存した活性化機構の解析**

**16:10** ○北囿喬斗，忻　詩博，田中直孝，田淵光昭（香川大農）

**2C17p10　永生細胞高出現変異株の抗菌剤耐性能評価と変異領域の解析**

**16:25** ○紅谷貴之[1]，金本真治[2]，永村光一[2]，御厨真幸[1]，松村吉信[2,3]（[1]関大院・生命生物工，[2]関西大・生命生物工，[3]関西大・ORDIST）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**2C17p11　酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* NBRC 3283 株における Dps ホモログの機能解析**
**16:50**　◦宮平響子，石川森夫，鈴木敏弘，勝木浩平，松原拓哉，貝沼(岡本)章子（東京農大・応生科・醸造）

**2C17p12　紅藻ガルデリアの糖添加による葉緑体白化・再緑化現象の解析**
**17:05**　◦宮澤和己[1]，　重信直人[1]，　兼崎　友[2]，　渡辺　智[1]，吉川博文[1]（[1]東農大農，[2]東農大 ゲノムセンター）

**2C17p13　シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC7942 における ParA 様タンパク質の機能解析**
**17:20**　◦渡辺　智[1]，野田(大林)明日翔[1]，内桶香那[1]，大林龍胆[2]，兼崎　友[3]，千葉櫻拓[1]，吉川博文[1]（[1]東京農大･バイオ，[2]遺伝研･細胞遺伝，[3]東京農大・NGRC）

**2C17p14　シアノバクテリアにおける新規高温耐性株の取得とリシーケンス解析**
**17:35**　◦兼崎　友[1]，　樋山智恵美[2]，　小澤啓吾[2]，　宮澤和己[2]，渡辺　智[2]，吉川博文[2]（[1]東京農大ゲノムセンター，[2]東京農大バイオ）

**2C17p15　難培養好熱性アーキアで発見されたユビキチンシステムの細胞内におけるタンパク質修飾機能解析**
**17:50**　◦萬代由莉恵[1]，　橘髙瑞奈[1]，　布浦拓郎[2]，　金井　保[1]，跡見晴幸[1]（[1]京大院工，[2]海洋研究開発機構）

**2C17p16　超好熱菌からの新規アセチルポリアミンの同定**
**18:05**　◦林　基煥[1]，　秀瀬涼太[1]，　小林正樹[2]，　新津　勝[2]，藤原伸介[1]（[1]関西学院大学，[2]城西大学）

## C18 会場　午前の部（9:20〜12:00）

微生物―遺伝子－発現制御，トランスクリプトーム―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**2C18a01　枯草菌でのラムノースおよびその誘導体の取り込みに関わる遺伝子群の発現解析**
**9:20**　◦広岡和丈，井川優望，藤澤聡美，藤田泰太郎 （福山大生命工・生物工）

**2C18a02　コリネ型細菌におけるメチオニン合成酵素 MetE の発現制御機構の解析**
**9:35**　◦高橋　慧，高田明香，岩井伯隆，和地正明 （東工大・生命理工学院）

**2C18a03　*Shewanella oneidensis* MR-1 株における CRP 依存的 D-乳酸代謝制御機構**
**9:50**　◦笠井拓哉，高妻篤史，渡邉一哉（東薬大生命）

**2C18a04　*Shewanella oneidensis* MR-1 株の MetR による嫌気呼吸制御機構の解明**
**10:05**　◦茂木久恵，高妻篤史，渡邉一哉（東薬大生命）

**2C18a05　*Acidithiobacillus ferrooxidans* における窒素固定制御転写因子 NifA の機能解析**
**10:20**　◦山田祥平，高妻篤史，渡邉一哉（東薬大生命）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**2C18a06　Lrp 様転写因子が酢酸菌の基幹代謝に及ぼす影響**
**10:45**　◦石井友理[1]，　赤坂直紀[2]，　佐古田久雄[2]，　秀瀬涼太[1]，阿部達明[3]，兼崎　友[4]，石川森夫[3]，貝沼(岡本)章子[3]，藤原伸介[1]（[1]関西学院大理工，[2]マルカン酢㈱，[3]東京農大・応生科醸造，[4]東京農大・ゲノムセンター）

**2C18a07　RNA-seq 法による酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* NBRC 3283 株の RpoE レギュロンの解析**
**11:00**　◦佐藤契太[1]，　石川森夫[1]，　鈴木敏弘[1]，　原田佳子[1]，勝間田憲子[1]，兼崎　友[2]，吉川博文[2,3]，貝沼(岡本)章子[1]（[1]東京農大・応生科・醸造，[2]東京農大・ゲノムセンター，[3]東京農大・応生科・バイオ）

**2C18a08　RNA-seq 法による酢酸菌 2 属のグルコース利用時における代謝戦略の比較解析**
**11:15**　◦阿部達明[1]，　石川森夫[1]，　鈴木敏弘[1]，　兼崎　友[2]，松原拓哉[1]，吉川博文[2,3]，貝沼(岡本)章子[1]（[1]東京農大応生科・醸造，[2]東京農大・ゲノムセンター，[3]東京農大応生科・バイオ）

**2C18a09　超好熱・好酸性古細菌 *Sulfolobus acidocaldarius* におけるアルギニン生合成酵素遺伝子の転写調節機構に関する研究**
**11:30**　◦中西史佳，富田武郎，葛山智久，西山　真（東大・生物工学セ）

**2C18a10　腸内細菌の中心代謝を制御する mRNA クロストーク**
**11:45**　◦宮腰昌利（秋田県大生資科）

## C18 会場　午後の部（14:00〜18:20）

微生物―遺伝子－構造，機能―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**2C18p01　麹菌 *A. oryzae* における HET ドメインを有するタンパク質の機能解析**
**14:00**　◦森　法子[1]，　北村　遼[1]，　片山琢也[1]，　岩下和裕[2]，丸山潤一[1]（[1]東大院・農生科・応生工，[2]酒総研）

**2C18p02　Analysis of a conserved transcriptional factor Ste12 in the regulation of cell fusion of *Aspergillus oryzae*.**
**14:15**　◦Taoning MO[1]，　Takuya KATAYAMA[1]，　Ozgur BAYRAM[2]，Daigo TAKEMOTO[3]，Gerhard H. BRAUS[4]，Katsuhiko KITAMOTO[1]，Jun-ichi MARUYAMA[1]（[1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]Dept. of Biol., Maynooth Univ., [3]Grad. School Bioagr. Sci., Nagoya Univ., [4]Dept. of Mol. Microbiol., Georg-August-University Gottingen）

**2C18p03　麹菌 *A. oryzae* における細胞損傷時の AoFus3 MAP キナーゼ経路の機能解析**
**14:30**　◦原田堅伍，矢萩大貴，北本勝ひこ，丸山潤一（東大院・農生科・応生工）

**2C18p04　麹菌 *A. oryzae* の菌核形成に必須な新規転写因子の解析**
**14:45**　◦藤井陽平[1]，　中村英淳[1]，　片山琢也[1]，　小川真弘[2]，小山泰二[2]，北本勝ひこ[1]，丸山潤一[1]（[1]東大院・農生科・応生工，[2]野田産研）

**2C18p05　麹菌 *A. oryzae* の分化に関与する LaeA 様メチルトランスフェラーゼの探索と機能解析**
**15:00**　◦川田純毅，丸山潤一（東大院・農生科・応生工）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**2C18p06　麹菌実用株における CRISPR/Cas9 システムを用いた効率的な多重変異株取得法の確立**
**15:25**　◦片山琢也[1]，藤井　渉[2]，丸山潤一[1]（[1]東大院・農生科・応生工，[2]東大院・農生科・応動）

**2C18p07　麹菌 *Aspergillus oryzae* の持つ分泌型ホスホリパーゼ $A_1$および関連リパーゼ類の機能解析**
**15:40**　◦中川原千咲，菊間隆志，有岡　学（東大院・農生科・応生工）

**2C18p08　糸状菌 *Aspergillus nidulans* の形態形成における AP2 複合体の機能解析**
**15:55**　◦金　京運，堀内裕之（東大院）

**2C18p09　放線菌プラスミド pSN22 由来 *tra* 遺伝子群ゲノム内挿入による染色体移行の解析**
**16:10**　◦佐藤李花，横井崇紘，宮武　徹，片岡正和（信州大学大学院）

**2C18p10　Streptomyces nigrifaciens 由来の環状プラスミド pSN22 をモデルとした，放線菌の接合伝達における必須因子 TraB の機能解析**
**16:25**　◦矢野嵩紘，宮武　徹，横井崇紘，片岡正和（信州大院・理工）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**2C18p11　接合伝達を用いた異種菌間巨大 DNA 移動ツールの構築**
**16:50**　◦恩田翔輝[1]，横井崇紘[1]，森　浩禎[2]，片岡正和[1]（[1]信大院，[2]奈良先端大）

**2C18p12　微生物殺虫剤 *Bacillus thuringiensis* の巨大プラスミドの構造変化と娘細胞への分配**
**17:05**　○野澤貴洋[1]，岩崎　誠[1]，武部　聡[2]，千　菊夫[1]（[1]信州大・農・応用生命，[2]近畿大・生物理工）

**2C18p13　アグロバクテリウムを用いた担子菌ウシグソヒトヨタケの形質転換**
**17:20**　○吉田佳奈子[1]，　須貝友紀[1]，　西尾智裕[1]，　下坂　誠[2]，千　菊夫[1]（[1]信州大・農・応用生命，[2]信州大・繊維・生物機能）

**2C18p14　IncP-9 群プラスミドの接合伝達に関わる全遺伝子の同定**
**17:35**　○岸田康平，　ルーカスティム，　大坪嘉行，　永田裕二，津田雅孝（東北大院生命）

**2C18p15　*Sphingobium* sp. SYK-6 株における β-aryl ether 代謝中間体・β-hydroxypropiovanillone 変換酵素遺伝子の機能解析**
**17:50**　○樋口雄大[1]，　竹浪寛樹[1]，　青木翔吾[1]，　上村直史[1]，菱山正二郎[2]，　笠井大輔[1]，　片山義博[3]，　福田雅夫[1]，　政井英司[1]（[1]長岡技科大・生物，[2]森林総研，[3]日大・生資科）

**2C18p16　*Sphingobium* sp. SYK-6 株におけるリグニン由来ビフェニル型化合物代謝系遺伝子の転写制御システム**
**18:05**　○新沼　皐[1]，　荒木拓馬[1]，　上村直史[1]，　笠井大輔[1]，片山義博[2]，福田雅夫[1]，政井英司[1]（[1]長岡技科大・生物，[2]日大・生資科）

## C19 会場　午前の部（9:20〜11:45）

微生物―細胞－複合微生物，共生微生物，難培養性微生物―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**2C19a01　高シュウ酸植物を摂食するハムシ腸内フローラの特性解析**
**9:20**　○大坪和香子[1]，　宮城敦子[2]，　クワンフーリーマイケル[1]，森　宙史[3]，黒川　顕[3]，小島紀幸[4]（[1]東北大農，[2]埼玉大理工，[3]国立遺伝研，[4]東北学院中高）

**2C19a02　*Bifidobacterium bifidum* 菌株間におけるヒトミルクオリゴ糖資化様式および関連酵素の保存性**
**9:35**　○後藤愛那[1]，　山田千早[1]，　苫米地祐輔[2]，　廣瀬潤子[3]，朝隈貞樹[4]，　浦島　匡[5]，　北岡本光[4]，　栗原　新[2]，　山本憲二[2]，原田　岳[6]，何　　方[6]，加藤紀彦[1]，片山高嶺[1]（[1]京大生命，[2]石川県大，[3]滋賀県大，[4]農研機構，[5]帯畜大，[6]タカナシ乳業）

**2C19a03　プロバイオティクス細菌を特異的に増殖させる次世代型プレバイオティクス・ガラクトシル-β-1,4-ラムノースの開発と偽膜性腸炎原因菌 *Clostridium difficile* の生育抑制**
**9:50**　○平野里佳[1]，　阪中幹祥[1]，　杉本直久[2]，　江口省吾[2]，奈良未沙希[1]，　片山高嶺[1,3]，　北岡本光[4]，　中井博之[2]，　栗原　新[1]（[1]石川県大生資環，[2]新潟大農，[3]京大生命，[4]農研機構・食品研）

**2C19a04　二種の腸内細菌の共培養によって明らかになったデオキシコール酸生成の活性化と新たな生成経路**
**10:05**　○横田　篤，タオテープサリンヤ，鳥居剛史，山崎真侑，吹谷　智（北大院農）

**2C19a05　野菜類における有用共生細菌 *Variovorax* sp. の局在性と生育への影響**
**10:20**　○田上桃子[1]，Natsagdorj Oyungerel[1,2]，Dolores Santiago Christine M.[1,2]，坂本寿代[1]，　O. Santiago Dennis Marvin[1]，　岡崎和之[3]，　池田成志[3]，大和田琢二[1,2]（[1]帯畜大，[2]岩手連大，[3]農研機構・北農研）

**a06〜a09 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**2C19a06　植物の生理機能を制御する好熱菌群，並びに根圏微生物群の微生物群集構造解析**
**10:45**　○宮本浩邦[1,2,3]，　須田　亙[2,4]，　堀内三吉[5]，　岩田菖子[1]，松浦真紀子[1,3]，　西内　巧[6]，　澤田有司[7]，　平井優美[7]，　服部正平[8]，児玉浩明[1]（[1]千葉大融合，[2]慶應大医，[3]サーマス，[4]東京大院新領域，[5]東京医科歯科大院医歯，[6]金沢大学際，[7]理研 CSRS，[8]早大先進理工）

**2C19a07　伝統的壺作り純米黒酢醸造における熟成期の菌叢解析**
**11:00**　○渡辺紳太[1]，　堀　知行[2]，　青柳　智[2]，　橋口和典[3]，長野正信[3]，藤井　暁[3]，新井博之[1]，石井正治[1]（[1]東大院農生科，[2]産総研・環境管理，[3]坂元醸造株式会社）

**2C19a08　DNA バーコードを用いた緑膿菌のポピュレーション解析**
**11:15**　○木戸玲子，新井博之，石井正治（東大院・農生科）

**2C19a09　好気呼吸機能関連遺伝子が微生物のコロニー形成に及ぼす影響**
**11:30**　○伊藤俊輔[1]，　佐藤伸吾[1]，　林真由美[1]，　野村一樹[1]，山口利男[2]，井口晃徳[1]，重松　亨[1]（[1]新潟薬科大学・応用生命科学部，[2]新潟薬科大学・薬学部）

## C19 会場　午後の部（14:00〜18:20）

微生物―細胞－栄養，生育，増殖―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**2C19p01　日本酒に含まれるバクテリア DNA**
**14:00**　○寺嵜桃香，高橋裕里香，西田洋巳（富山県大）

**2C19p02　ヒト腸内細菌のオリゴ糖代謝能と代謝産物**
**14:15**　○小瀬理市[1]，　栃尾　巧[2]，　蓑田香奈子[2]，　平野勝紹[2]，中川純一[1]，遠藤明仁[1]（[1]東農大生物産業，[2]物産フードサイエンス研究開発センター）

**2C19p03　生きた麹菌の摂取が腸内環境に与える影響**
**14:30**　○山田和広[1]，　都築　翔[1]，　高田真由香[1]，　村田俊輔[1]，丸井萌子[1]，　長澤麻央[1]，　林　利哉[1]，　片山琢也[2]，　丸山潤一[2]，兒島孝明[3]，中野秀雄[3]，志水元亨[1]，加藤雅士[1]（[1]名城大 農，[2]東大院 農生科 応生工，[3]名大院 生命工 生命技術）

**2C19p04　*Bifidobacterium animalis* における酸素感受性株の分離とその性状の解析**
**14:45**　○山本裕司，田中日向子，長坂早希子，向井孝夫（北里大獣医）

**2C19p05　*Bacillus subtilis* 168 株芽胞の発芽レセプター欠損株に対する香辛料精油成分の発芽阻害作用**
**15:00**　○阪井俊夫[1]，坂元　仁[2,3]，土戸哲明[2]，古田雅一[1,2]（[1]大阪府大院工，[2]大阪府大 21 科研，[3]大阪府大 放研セ）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**2C19p06　大腸菌の放射線処理における損傷細胞の評価**
**15:25**　○岩田吏世[1]，　西谷巧太[1]，　坂元　仁[2,3]，　土戸哲明[2,3]，古田雅一[1,2,3]（[1]大阪府大院工，[2]大阪府大 21 科研，[3]大阪府大放研セ）

**2C19p07　寒天培地上での大腸菌細胞における酸化ストレスの解析**
**15:40**　○坂元　仁[1,2]，岩田吏世[3]，古田雅一[1,2,3]，土戸哲明[1]（[1]大阪府大 21 科研，[2]大阪府大放研セ，[3]大阪府大院工）

**2C19p08　低温飢餓に曝された大腸菌のコロニー形成の制御に関わる遺伝子の解析**
**15:55**　○西尾優宏，浅井健宏，小川哲弘，日髙真誠，正木春彦（東大院農生科・応工）

**2C19p09　大腸菌の長期生存に寄与する変異の解析**
**16:10**　○脇　義賢[1]，　川口純平[1]，　増田知美[1]，　村田正之[1]，高坂智之[2]，山田　守[1,2]（[1]山口大学・医，[2]山口大学・創科・山口大中温微生物セ）

**2C19p10　環境常在細菌に見出された新規低栄養環境適応機構に関する研究**
**16:25**　○稲葉慎之介，加藤広海，大坪嘉行，津田雅孝，永田裕二（東北大・院生命科）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**2C19p11　枯草菌における栄養状態に応じた新規 GTP 制御機構の解析**
**16:50**　○大坂夏木[1]，　高田　啓[2]，　多喜乃雄太[1]，　兼崎　友[3]，渡辺　智[1]，千葉櫻拓[1]，吉川博文[1]（[1]東京農大・バイオ，[2]立教大学・理・生命理学，[3]東京農大・ゲノム解析セ）

**2C19p12　カンピロバクターの株間における酸耐性能の比較**
**17:05**　○稲田慎也，江口陽子（近畿大学生物理工）

**2C19p13　土壌での放線菌の生理・生態解析を目指した *Streptomyces griseus* の滅菌土壌培養**
**17:20**　○河内護之，手塚武揚，妹尾啓史，大西康夫（東大院・農生科）

**2C19p14　*Staphylococcus aureus* に対するパルミトレイン酸の抗菌活性メカニズムの検討**
**17:35**　◦大西耕平[1]，　畑中優佳[2]，　藤川真理子[2]，　安井夕貴[2]，倉田淳志[1]，永尾寿浩[3]，岸本憲明[1]（[1]近大院農，[2]近大農，[3]大阪市立工業研究所）

**2C19p15　皮膚菌叢の健全化を目指した *Stapylococcus aureus* と *S. epidermidis* の共培養によるパルミトレイン酸の選択的抗菌活性の評価**
**17:50**　◦永尾寿浩[1]，田中重光[1]，倉田淳志[2]，岸本憲明[2]（[1]阪市工研，[2]近畿大院農）

**2C19p16　*Pseudomonas resinovorans* CA10dm4 株はプラスミド「非感受性」の宿主である**
**18:05**　◦河野　響，上田朋美，水口千穂，岡田憲典，野尻秀昭（東大・生物工学セ）

## C20 会場　午前の部（9:20〜12:00）

微生物―その他―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**2C20a01　ストレプトマイシンがメカノセンシティブチャネルの開口特性に与える影響**
**9:20**　◦野畑和宏[1]，橋本賢一[1]，中山義敬[2]，川崎　寿[1]（[1]東電大院工・物質工，[2]ビクターチャン心臓病研究所）

**2C20a02　メカノセンシティブチャネルが熱ストレス後の細胞生存に関与する**
**9:35**　◦神杉裕輝，高倉有太，野畑和宏，橋本賢一，川崎　寿（東電大工・環境化）

**2C20a03　細菌のペプチドグリカン層に対する $TiO_2$ 光触媒反応の影響**
**9:50**　◦大嶋佑治[1]，　芦田美稀[1]，　荻原稜平[1]，　岡本歩未[1]，藤嶋　昭[2]，鈴木智順[1,2]（[1]東理大 応生，[2]東理大 総研）

**2C20a04　真菌に対する光触媒反応の影響**
**10:05**　◦梶原雄太郎[1]，　並木康之[1]，　池北雅彦[2]，　藤嶋　昭[2]，鈴木智順[1,2]（[1]東理大 応生，[2]東理大 総研）

**2C20a05　生物学的処理および光触媒・boron-doped diamond 電極併用汚水浄化システムの構築と評価**
**10:20**　◦井手口真理[1]，　佐藤俊貴[1]，　落合　剛[2,3]，　森戸祐幸[2,4]，藤嶋　昭[2,3]，鈴木智順[1,2]（[1]東理大 応生，[2]東理大 総研，[3]KAST，[4]ユーヴィックス株式会社）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**2C20a06　*Corynebacterium glutamicum* における 2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ制御因子 OdhI のアシル化部位の機能解析**
**10:45**　◦阿部理乃[1]，西山　真[1]，古園さおり[1,2]（[1]東大･生物工学セ，[2]理研 CSRS）

**2C20a07　Corynebacterium glutamicum 由来 Phosphoenolpyruvate carboxylase における Pup 化修飾の機能解析**
**11:00**　◦濱本勇磨[1,2]，　永野　愛[2]，　西山　真[1]，　古園さおり[1,3]（[1]東大生物工学セ，[2]協和発酵バイオ，[3]理研 CSRS）

**2C20a08　包括的土壌評価システムの実現に向けて**
**11:15**　◦万里千裕，　大熊康介，　鈴木聖一，　吉野定男，五十嵐由美子（日立製作所）

**2C20a09　加圧熱水処理によるフェノール系抗菌剤の殺菌性向上メカニズムの解析**
**11:30**　◦田邊弘毅，宮原佳子，宇田晶宏，高橋　塁，岩井秀隆，阿部哲也，遠藤浩二，土倉豊樹，永井　智，久保田浩美（花王）

**2C20a10　東京湾に生息する Mimivirus 科ウイルスの分離と解析**
**11:45**　◦三上達也，武村政春（東理大）

## C20 会場　午後の部（14:00〜17:50）

微生物―細胞－構造，オルガネラ，小胞，分泌，細胞構成分子―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**2C20p01　出芽酵母におけるホスホリパーゼ $A_1$ の生理学的機能の解析**
**14:00**　◦森貞志穂[1]，西田郁久[2]，川向　誠[2]，堀内裕之[1]，福田良一[1]（[1]東大院・農生科・応生工，[2]島根大・生物資源・生命工）

**2C20p02　出芽酵母液胞アミノ酸トランスポーター Avt4 の合成と合成後における調節について**
**14:15**　◦村上瑛夢[1]，　杉本　航[1]，　兵頭美波[1]，　児玉理美[1]，佐藤有美香[1]，石本晶也[1]，河田美幸[1,2]，関藤孝之[1]　（[1]愛媛大農，[2]愛媛大学術支援セ）

**2C20p03　出芽酵母セラミド合成酵素サブユニット Lip1 の機能解析**
**14:30**　◦田淵光昭[1]，　石野裕子[1]，　吉川大地[1]，　谷　元洋[2]，橋井圭介[1]，田中直孝[1]（[1]香川大農，[2]九州大院理）

**2C20p04　出芽酵母の Erv14 は Erv25 と相互作用し Gasl の輸送に関与する**
**14:45**　◦高實　優，足立博之，依田幸司，野田陽一（東大院・農生科・応生工）

**2C20p05　分裂酵母の胞子細胞膜形成における Sec2 の働き**
**15:00**　◦畑中彩花，今田一姫，中村太郎（大阪市大院理）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**2C20p06　分裂酵母の核サイズ制御機構**
**15:25**　◦久米一規（広島大先端研）

**2C20p07　耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* は嫌気条件下でマイトファジーを誘導する**
**15:40**　◦星田尚司，賀川翔太，赤田倫治（山口大院・創成科学・化学系）

**2C20p08　細菌による多糖輸送：アルギン酸取り込み細菌と分泌細菌の特異な細胞表層構造**
**15:55**　◦橋本　渉[1]，村田幸作[2]　（[1]京大院・農，[2]摂南大・理工）

**2C20p09　Analysis of a protein secretion mechanism via the membrane vesicle production of a cold-adapted bacterium, Shewanella sp. HM13**
**16:10**　◦Chen CHEN[1]，　Soichiro KAWAI[1]，　Jun KAWAMOTO[1]，Tomoya IMAI[2]，Tatsuo KURIHARA[1]　([1]Institute for Chemical Research, Kyoto University, [2]Research Institute for Sustainable Humanosphere, Kyoto University)

**2C20p10　*Paracoccus denitrificans* においてプロファージ遺伝子 *lys* はストレス条件下での MV 産生に必要である**
**16:25**　◦安田まり奈[1]，　豊福雅典[2]，　森永花菜[3]，　尾花　望[2]，野村暢彦[2]（[1]筑波大生命環境，[2]筑波大生命環境系，[3]筑波大院生命環境科学）

**p11〜p14 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**2C20p11　メンブランベシクルの菌体付着には LPS が関与する**
**16:50**　◦諏佐勇磨，黒沢正治，豊福雅典，尾花　望，野村暢彦（筑波大生命環境）

**2C20p12　ウェルシュ菌の膜小胞を介した宿主免疫応答誘導メカニズムの解析**
**17:05**　◦永山恭子[1]，　尾花　望[2]，　中尾龍馬[3]，　泉福英信[3]，中村幸治[2]，野村暢彦[2]（[1]筑波大・院・生命環境，[2]筑波大・生命環境系，[3]感染研・細菌一）

**2C20p13　活性汚泥におけるメンブランベシクルの生産**
**17:20**　◦鬼澤里奈，豊福雅典，森永花菜，尾花　望，野村暢彦（筑波大・生命環境）

**2C20p14　好熱性細菌 *Meiothermus ruber* H328 株の *degP* 遺伝子破壊株を用いた膜小胞産生に関する研究**
**17:35**　◦渡部邦彦[1]，大西愛航[1]，清水　歩[1]，西　海斗[1]，川崎一則[2]（[1]京都府大院生環，[2]産総研・生命工学）

## C23 会場　午前の部（9:20〜12:00）

微生物―物質生産－醸造，発酵（一次代謝産物）―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**2C23a01　*Halomonas* sp. KM-1 株による好気培養条件化でのクエン酸の効率的な分泌生産**
**9:20**　◦河田悦和[1]，　盤若明日香[2]，　西村　拓[2]，　松下　功[2]，坪田　潤[2]（[1]産総研，[2]大阪ガス）

**2C23a02　*Citrobacter braakii* TB-96 株における 1,3-プロパンジオール生産増強のための低有機酸生産株の取得**
**9:35**　◦森田峻秀，清　啓自，野中大輔，中島敏明（筑波大院生命環境）

**2C23a03　オフタルミン酸の新規発酵生産法の確立**
**9:50**　◦所真衣子, 伊藤智和, 邊見　久, 吉村　徹（名大院生命農）

**2C23a04　アミノ酸置換による 2-deoxy-scyllo-inososе（DOI）合成酵素活性の強化**
**10:05**　◦鈴木涼子[1]，山崎晴丈[1]，伏信進矢[2]，高久洋暁[1]（[1]新潟薬大・応生科，[2]東大院農）

**2C23a05　組換え大腸菌による糖からの(-)-*vibo*-quercitol の高発酵生産**
**10:20**　◦荒　学志，川崎優気，山崎晴丈，高久洋暁（新潟薬大）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**2C23a06　還元力高産生コリネ型細菌によるペントース-リン酸経路非依存バリン発酵**
**10:45**　◦堀　一将[1]，　田中利果[1]，　林　幹朗[2]，　竹野誠記[1]，池田正人[1]（[1]信州大農・応生科，[2]協和発酵バイオ）

**2C23a07　コリネ型細菌における新規脂肪酸増産変異**
**11:00**　◦村田紀子[1]，　内藏　萌[1]，　林　幹朗[2]，　竹野誠記[1]，池田正人[1]（[1]信州大農・応生科，[2]協和発酵バイオ）

**2C23a08　ピメリン酸バイオアッセイ用に開発した指示菌 BioF-4 株の特性解析**
**11:15**　◦川上春佳[1]，　加藤峻介[1]，　林　幹朗[2]，　竹野誠記[1]，池田正人[1]（[1]信州大農・応生科，[2]協和発酵バイオ）

**2C23a09　コリネ型細菌の持つ 2 種の I 型脂肪酸合成酵素のリポ酸合成への関与**
**11:30**　◦中村絵梨[1]，　長島　堯[1]，　林　幹朗[2]，　竹野誠記[1]，池田正人[1]（[1]信州大農・応生科，[2]協和発酵バイオ）

**2C23a10　油脂（triacylglycerol）を分泌する酵母の解析**
**11:45**　◦村川直美，松崎浩明，秦野琢之（福山大生命工）

## C23 会場　午後の部（14:00〜18:20）

微生物―物質生産－醸造，発酵（一次代謝産物）―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**2C23p01　油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の油脂高蓄積変異株の取得と油脂合成・分解関連重要遺伝子の同定**
**14:00**　◦小林鈴花[1]，　海老名沙也佳[1]，　阿部史歩[1]，　山崎晴丈[1]，志田洋介[2]，小笠原渉[2]，高久洋暁[1]（[1]新潟薬大・応生科，[2]長岡技科大・工）

**2C23p02　油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* における油脂高蓄積変異株の育種**
**14:15**　◦海老名沙也佳[1]，　春日琴葉[1]，　志田洋介[2]，　小笠原渉[2]，山崎晴丈[1]，高久洋暁[1]（[1]新潟薬大・応生科，[2]長岡技科大・工）

**2C23p03　油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* における脂肪酸の分泌発酵生産**
**14:30**　◦佐野真那理[1]，　志田洋介[2]，　小笠原渉[2]，　山崎晴丈[1]，高久洋暁[1]（[1]新潟薬大・応生科，[2]長岡技科大・工）

**2C23p04　核酸生産菌へのメカノセンシティブチャネル遺伝子の導入効果**
**14:45**　◦森　陸也，小西智之，三井田周平，橋本賢一，川崎　寿（東京電機大学）

**2C23p05　分子動力学シミュレーションを用いた Tween 40 による *Corynebacterium glutamicum* のグルタミン酸過剰生成誘導機構における機械刺激応答の解析**
**15:00**　◦澤田康之[1]，　橋本賢一[2]，　中松　亘[2]，　曽我部正博[1]，川崎　寿[2]（[1]名大院・医，[2]東京電機大・工）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**2C23p06　*Saccharomyces bayanus* 菌株のパン生地発酵力の改良**
**15:25**　◦横山　愛，川上秋桜，山内宏昭，小田有二（帯広畜産大食品）

**2C23p07　黒麹菌による甘柿および渋柿成熟果の発酵および機能性への影響**
**15:40**　◦折居千賀（(公財)東洋食品研究所）

**2C23p08　乳酸菌 *Enterococcus faecalis* に見出された好気性乳酸発酵の発現メカニズムの解明**
**15:55**　◦土肥裕希（岡山理大・工）

**2C23p09　泡盛もろみより新たに分離された乳酸菌フェノール脱炭酸酵素遺伝子の機能解析**
**16:10**　◦仲宗根薫，上原　誠（近畿大工）

**2C23p10　コリネ型細菌のシステイン生産におけるシスチン取り込みタンパク質ホモログ欠損の効果**
**16:25**　◦近藤麻梨子，平沢　敬（東工大生命理工学院）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**2C23p11　納豆菌及び枯草菌によるう蝕原性バイオフィルム抑制効果の検討**
**16:50**　◦中村知世，成澤直規，鳥居恭好，竹永章生（日大院・生資科）

**2C23p12　農産品由来プロバイオティクスの機能性評価**
**17:05**　◦根来雄哉，高屋朋彰（小山高専物質）

**2C23p13　各種初発条件における生酛酒母の成分及び微生物叢解析に関する研究**
**17:20**　◦下田隆正[1]，高橋正之[2]，奥田将生[1,2]　（[1]広大生物圏，[2]酒総研）

**2C23p14　希少糖 D-Psicose が酢酸菌 *Acetobacter aceti* の酢酸発酵に及ぼす影響**
**17:35**　◦吉田大地，小川綾子，小川雅廣，早川　茂（香大院農）

**2C23p15　アスパラギン酸脱炭酸活性を有する耐塩性乳酸菌の分離と魚醤油発酵スターターとしての利用**
**17:50**　◦脇中琢良[1]，　岩田聡実[1]，　渡部　潤[1]，　月岡祐一郎[1]，柴田由起[2]，木村メイコ[3]，福井洋平[3]，里見正隆[3]　（[1]ヤマサ醤油，[2]ブレッシングフェバー，[3]水産機構中央水研）

**2C23p16　イオンビーム変異誘導法による Cellulase 分泌耐熱性 Ethanol 生産糸状菌の構築**
**18:05**　◦山下聖樹[1]，高野真希[1]，畑下昌範[2]，星野一宏[1]（[1]富大院理工，[2]若狭湾エネ研）

## C24 会場　午前の部（9:20〜12:00）

微生物―代謝－代謝調節，発酵生理，メタボローム―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**2C24a01　大腸菌の新規プトレッシン排出タンパク SapBCDF の同定**
**9:20**　◦杉山友太[1]，　中村篤央[2]，　松本光晴[2]，　神戸亜也香[3]，阪中幹祥[1]，東　恭平[4]，五十嵐一衛[5]，片山高嶺[1,6]，鈴木秀之[3]，栗原　新[1]（[1]石川県大，[2]協同乳業，[3]京都工繊大院応生，[4]千葉大院薬，[5]アミンファーマ，[6]京大院生命）

**2C24a02　好熱菌発酵産物を給与した採卵鶏における腸内乳酸菌叢内の変化**
**9:35**　◦青井洋太[1]，　吉川翔太[1]，　須田　亙[2,5]，　井藤俊行[4]，小野瀬曉[4]，服部正平[5,6]，宮本浩邦[1,2,3]，児玉浩明[1]　（[1]千葉大・融合，[2]慶応大・医，[3]サーマス，[4]京葉プラントエンジニアリング，[5]東京大院・新領域，[6]早大先進理工）

**2C24a03　好熱菌発酵産物由来のプロバイオティクス候補菌 *Bacil-***

***lus coagulans* の代謝特性の解析**
**9:50** ○宮本理菜[1]，吉川翔太[1]，宮本浩邦[1,2,3,4]，中西裕美子[4]，大野博司[4]，児玉浩明[1]（[1]千葉大院・融合，[2]日環科学，[3]サーマス，[4]理研 IMS）

**2C24a04　根粒菌 *Bradyrhizobium diazoefficiens* 由来レアアース依存的メタノール脱水素酵素の酵素科学的性質**
**10:05** ○菅沼宗矢[1]，王　倫[1]，日比野歩美[1]，三井亮司[2]，谷　明生[3]，海老原章郎[1]，早川享志[1]，中川智行[1]（[1]岐阜大学応生，[2]岡山理大理，[3]岡山大植物研）

**2C24a05　*Pichia methanolica* の高メタノール生育阻害は代謝中間体ホルムアルデヒドに起因する**
**10:20** ○土井遼平，若山敬嗣，蓮實涼子，早川享志，中川智行（岐阜大応生）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**2C24a06　ヒト腸内細菌 *Bacteroides thetaiotaomicron* のポリアミン代謝・輸送系の解明**
**10:45** ○阪中幹祥[1]，杉山友太[1]，片山高嶺[1,2]，栗原　新[1]（[1]石川県大，[2]京大生命）

**2C24a07　大腸菌におけるピリドキサール-5'-リン酸の恒常性における脱リン酸化酵素 YbhA の役割**
**11:00** ○杉本良太[1,2]，斎藤菜摘[3,4]，島田友裕[1]，田中　寛[1,2]（[1]東工大化生研，[2]東工大総，[3]鶴岡高専，[4]慶応大学）

**2C24a08　*Acidomonas* 属酢酸菌のレアアースに対する応答**
**11:15** ○宇都宮大貴[1]，山本麻衣子[1]，三井亮司[2]，阿野嘉孝[1]（[1]愛媛大院農・生命機能，[2]岡山理大理）

**2C24a09　根圏細菌 *Pseudomonas putida* における DOPA 脱炭酸酵素の発現調節因子の同定**
**11:30** ○谷内寛之[1]，那須駿太[1]，中川　明[1]，栗原　新[1]，片山高嶺[1,2]，小柳　喬[1]（[1]石川県大生資環，[2]京大生命）

**2C24a10　メタノール培養時に誘導される酵母 *Pichia pastoris* SSS ファミリートランスポーターの機能解析**
**11:45** ○芝田桃子[1]，大澤　晋[1]，由里本博也[1]，寶関　淳[1,2]，阪井康能[1,2]（[1]京大院農，[2]京大・生理化学）

## C24 会場　午後の部（14:00〜18:20）

微生物―遺伝子－発現制御，トランスクリプトーム―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**2C24p01　糸状菌と植物の糖鎖生合成に関与する諸酵素に関する研究（奨励賞受賞講演）**
**14:00** ○岡　拓二（崇城大学生物生命学部）

**2C24p02　糸状菌 *Talaromyces cellulolyticus* の糖化酵素遺伝子の発現機構の解析**
**14:15** ○藤井達也[1]，井上宏之[1]，石川一彦[2]，星野　保[1]（[1]産総研・機能化学研究部門，[2]産総研・バイオメディカル研究部門）

**2C24p03　*Aspergillus aculeatus* セルラーゼ生産制御機構における SepM の機能解析**
**14:30** ○津村亮輔，谷　修治，炭谷順一，川口剛司（阪府大・生環）

**2C24p04　*Aspergillus aculeatus* の SR protein-specific kinase F が関わる情報伝達経路の遺伝学的解析**
**14:45** ○片山椋平，谷　修治，炭谷順一，川口剛司（阪府大院生環）

**2C24p05　メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* における Hap 複合体の機能解析**
**15:00** ○小田沙織[1]，由里本博也[2]，阪井康能[2]（[1]鳥取大工，[2]京大院農）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**2C24p06　超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* の転写制御因子 Lrp/AsnC に関する研究**
**15:25** ○福田青郎[1]，内田圭亮[1]，ジャジリアブドルアジズ[1]，市村瑞葉[1]，何あゆみ[1]，金井　保[2]，跡見晴幸[2]，今中忠行[1]（[1]立命館大生命，[2]京大院工）

**2C24p07　大腸菌 CsrD による小分子 RNA CsrB の分解制御**
**15:40** ○鈴木一史[1,2]，天木拓海[1]，坂井　航[1]，杉本華幸[1,2]，渡邉剛志[1,2]（[1]新潟大院・自然科学，[2]新潟大・農・応生化）

**2C24p08　枯草菌 PBSX ファージの誘導機構の解析**
**15:55** ○山本達也，野村暢彦（筑波大生命環境）

**2C24p09　多芸多才な微生物 Alcaligenes denitrificans A41 株のポリヒドロキシアルカン酸（PHA）合成関連遺伝子群の制御**
**16:10** ○木原天衣，前田理久（明治大学農学研究科農芸化学専攻）

**2C24p10　植物由来 *Pseudomonas chlororaphis* の抗菌物質フェナジン生産における Quorum Sensing 多重制御機構の解析**
**16:25** ○諸星知広[1]，山口貴人[1]，謝　肖男[2]，竹内香純[3]，染谷信孝[3]（[1]宇大院工，[2]宇大バイオ，[3]農研機構）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**2C24p11　改変型リボソーム構築による異種間における翻訳開始機構の多様性の解析**
**16:50** ○渡辺正樹[1]，渡辺　葵[1]，渡辺　智[1]，赤沼元気[2]，河村富士夫[1,2]，吉川博文[1]（[1]東京農大・院・バイオ，[2]立教大・生命理学）

**2C24p12　pCAR1 上のカルバゾール分解遺伝子群の発現は一細胞レベルでどのように異なっているか？**
**17:05** ○高比良早紀，山本夏実，水口千穂，岡田憲典，野尻秀昭（東大・生物工学セ）

**2C24p13　プラスミド・宿主染色体由来 H-NS ファミリータンパク質のヘテロ多量体形成機構**
**17:20** ○水口千穂[1]，ヴァシレヴァデリアナ[1]，藤本　瑞[2]，寺田　透[3]，岡田憲典[1]，野尻秀昭[1,3]（[1]東大・生物工学セ，[2]農研機構，[3]東大院農生科・アグリバイオ）

**2C24p14　Quantification of H-NS family proteins in *Pseudomonas putida***
**17:35** ○Zongping SUN[1,2]，Delyana VASILEVA[1]，Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1]，Kazunori OKADA[1]，Feng LUO[2]，Yasuo IGARASHI[2]，Hideaki NOJIRI[1,2]（[1]The Univ. of Tokyo, [2]Southwest Univ.）

**2C24p15　プラスミド・宿主染色体由来 H-NS ファミリータンパク質の DNA との結合親和性の定量**
**17:50** ○角埜裕基[1]，水口千穂[1]，高橋裕里香[2]，岡田憲典[1]，野尻秀昭[1]（[1]東大・生物工学セ，[2]富山県大生工科・生工セ）

**2C24p16　青枯病菌における TBDR の機能解析**
**18:05** ○大西浩平[1]，渡邉諒介[2]，木場章範[2]，曳地康史[2]（[1]高知大総研セ，[2]高知大農）

## C25 会場　午前の部（9:20〜12:00）

微生物―物質生産－発酵（二次代謝産物，抗生物質，ペプチド，生理活性物質）―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**2C25a01　*Lactobacillus kunkeei* FF30-6 が生産する抗ヨーロッパ腐蛆病菌活性を有する新奇バクテリオシンの同定**
**9:20** ○大橋千紘[1]，前野慎太郎[2]，朴　興国[1]，善藤威史[1]，SALMINEN Seppo[3]，遠藤明仁[2]，園元謙二[1,4]（[1]九大院・農，[2]東農大院・生物産業，[3]トゥルク大・食品機能フォーラム，[4]九大・バイオアーク）

**2C25a02　*Leuconostoc* 由来新奇環状抗菌ペプチド，ロイコサイクリシン Q の生合成機構の解析**
**9:35** ○池田史織[1]，高城博也[1]，石橋直樹[1]，善藤威史[1]，園元謙二[1,2]（[1]九大院・農，[2]九大・バイオアーク）

**2C25a03　*Lactococcus* 由来新奇環状抗菌ペプチド，ラクトサイクリシン Q の生合成機構の解析**
**9:50** ○善藤威史[1]，高城博也[1]，石橋直樹[1]，池田史織[1]，沢　稔彦[1]，園元謙二[1,2]（[1]九大院・農，[2]九大・バイオアーク）

**2C25a04　*Leuconostoc mesenteroides* 406 および 213M0 は同一のバクテリオシンを産生する**
**10:05** ○荒川健佑[1]，羽野知紘[1]，吉田早紀[1]，宮本　拓[1,2]，森田英利[1]（[1]岡山大院環境生命，[2]くらしき作陽大食文化）

奨励賞受賞講演

**2C25a05　乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* 由来食物繊維，菌体外多糖を介した腸内細菌－宿主糖代謝相互作用連関の解明と機能性食品素材応用**
**10:20**　◦久　景子[1,2]，　宮本潤基[3]，　清水祐希[3]，　松﨑千秋[1]，柴田光治[2]，　清水秀憲[2]，　中島　啓[3]，　山本憲二[1]，　木村郁夫[3]（[1]石川県立大 生物資源工学研，[2]日東薬品工業株式会社，[3]東京農工大学 大学院農学研究院）

**a06～a10 発表者の接続時間 10:35～10:45**

**2C25a06　細菌の紫色色素，ヴィオラセイン化合物のチロシナーゼ阻害活性**
**10:45**　◦滝口泰之，安川卓実，今野遥夏（千葉工大工）

**2C25a07　糖を用いた難水溶性色素の包接化及び抗菌活性**
**11:00**　◦川上玲奈，滝口泰之（千葉工大）

**2C25a08　放線菌 *S. incarnatus* の RNA ポリメラーゼ多重変異の分子構造モデル**
**11:15**　◦田村　隆[1]，　中島佑里子[1]，　平野敏行[2]，　佐藤文俊[2]，根本理子[1]，稲垣賢二[1]（[1]岡山大院・環境生命，[2]東大・生研）

**2C25a09　高知県沖海綿に生息する放線菌の多様性と生理活性物質生産能**
**11:30**　◦野田大貴[1]，　木谷　茂[1]，　富岡寿也[1]，　ウラノバダナ[2]，津田正史[3]，荒井雅吉[4]，仁平卓也[1]（[1]阪大・生物工学国際交流セ，[2]高知大・農林海洋，[3]高知大・海洋コア，[4]阪大院・薬）

**2C25a10　*Fusarium graminearum* におけるアミノ酸代謝のトリコテセン生産制御への影響**
**11:45**　◦中嶋佑一[1]，　前田一行[2]，　晋　琦[1]，　塩原拓也[1]，鬼頭良幸[1]，　金丸京子[1]，　小林哲夫[1]，　西内　巧[3]，　木村　真[1]（[1]名大院生命農，[2]明治大院濃，[3]金沢大・学際科学）

## C25 会場　午後の部（14:00～18:20）

微生物―物質生産－発酵（二次代謝産物，抗生物質，ペプチド，生理活性物質）―

**p01～p05 発表者の接続時間 13:50～14:00**

**2C25p01　ミコール酸含有細菌に対する放線菌の網羅的転写応答解析**
**14:00**　◦浅水俊平，菅井佳宣，尾仲宏康（東大院農）

**2C25p02　複合培養における放線菌の二次代謝活性化に関与する遺伝子のイオンビームを用いた逆遺伝学的解析**
**14:15**　◦栁澤昌臣[1]，　浅水俊平[1]，　菅井佳宣[1]，　佐藤勝也[2]，尾仲宏康[1]（[1]東大院農，[2]量研機構）

**2C25p03　薬剤ターゲットを Ffh とするゴードスポリンの新規作用機構解析**
**14:30**　◦金田　彬[1]，　尾崎太郎[1]，　菅井佳宣[1]，　浅水俊平[1]，千田俊哉[2]，尾仲宏康[1]（[1]東大院農，[2]高エネ研）

**2C25p04　試験管内完全合成系によるゴードスポリン生合成経路の解析とデザイナーアナログ創製**
**14:45**　◦尾仲宏康[1]，　尾崎太郎[1]，　山下湖奈[1]，　後藤佑樹[2]，下村杜人[1]，林　昌平[1]，浅水俊平[1]，菅井佳宣[1]，菅　裕明[2]（[1]東大農，[2]東大理）

**2C25p05　新規 RiPPs-ポリケタイドハイブリット化合物の生合成経路解析**
**15:00**　◦菅井佳宣，浅水俊平，尾仲宏康（東大院農）

**p06～p10 発表者の接続時間 15:15～15:25**

**2C25p06　微生物由来揮発性有機化合物を指標とした真菌感染症の早期診断法の開発**
**15:25**　◦伊東芙美花[1]，　首藤明子[2]，　清水浩美[2]，　楊　彩佳[3]，戸根一哉[3]，槇村浩一[3]，岩口伸一[1]（[1]奈良女子大学，[2]奈良県産業振興総合センター，[3]帝京大学）

**2C25p07　NMR analysis of actinobacterial culture extracts after addition of primary metabolism inhibitor**
**15:40**　◦Dana Ulanova[1,2]，Masashi Tsuda[1,2]（[1]Faculty of Agriculture and Marine Science, Kochi University, [2]Center for Advanced Marine Core Research, Kochi University）

**2C25p08　放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3（2）での抗生物質リンコマイシンのホルミシス効果による二次代謝活性化の分子生物学的機構の解析**
**15:55**　◦下野和真[1]，　石塚美咲[1]，　今井　優[2]，　越智幸三[3]，保坂　毅[4]（[1]信大院農，[2]ノースイースタン大，[3]広工大生命，[4]信大バイオメディカル研）

**2C25p09　代謝工学によるアスタキサンチン産生海洋性ラン藻の開発と代謝メカニズムの解明**
**16:10**　◦高木綾湖，蓮沼誠久，近藤昭彦（神大イノベ）

**2C25p10　細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* の細胞集合と胞子成熟の機能経路に関する研究**
**16:25**　◦近藤杏奈[1]，　成田隆明[3]，　村田ちひろ[1]，　臼杵豊展[2]，齊藤玉緒[2]（[1]上智大学大学院，[2]上智大院，[3]ダンディー大学）

**p11～p16 発表者の接続時間 16:40～16:50**

**2C25p11　Curvularia clavata が生産する抗菌性環状ペプチド化合物の生合成遺伝子クラスターの同定**
**16:50**　◦山口滋生[1]，　藤岡智則[1]，　吉見　啓[2]，　梅村舞子[4]，町田雅之[4]，阿部敬悦[2,3]，河合　清[1]（[1]クミアイ化学，[2]東北大・未来研，[3]東北大院農・生物産業創成，[4]産総研）

**2C25p12　麹菌における抗菌性環状ペプチド化合物 KK－1 の異種生産**
**17:05**　◦吉見　啓[1]，　山口滋生[2]，　藤岡智則[2]，　河合　清[2]，町田雅之[3]，阿部敬悦[1,4]（[1]東北大・未来研，[2]クミアイ化学工業，[3]産総研・生物プロセス，[4]東北大院農）

**2C25p13　根の存在下で赤色色素を生産する植物由来放線菌の全ゲノム配列の決定**
**17:20**　◦石垣祐二[1]，　尾納隆大[2]，　山口勝司[2]，　長谷部光泰[2]，重信秀治[2]，白須　賢[1]（[1]理研 CSRS，[2]基生研）

**2C25p14　島おから由来 GABA 高産生乳酸菌の単離とゲノム解析**
**17:35**　◦木村碧樹，多田一風太，服部　暉，宮城　誠，池松真也（沖縄高専）

**2C25p15　HMG-CoA reductase inhibitor FR901512 高生産への鍵遺伝子 SREBPs に関する解析**
**17:50**　◦伊東広哉[1,3]，　松井　真[1]，　三浦　愛[2]，　荒添貴之[4]，熊谷俊高[5]，　西田敬二[4]，　玉野孝一[2]，　町田雅之[2,3]，　柴田　孝[1,3]（[1]アステラス製薬，[2]産総研，[3]TRAHED，[4]神戸大院科技，[5]ファームラボ）

**2C25p16　アキアカネ糞由来 *Pseudomonas* 属細菌のカロテノイド生合成酵素遺伝子の単離・機能解析**
**18:05**　◦深谷祐貴[1]，　竹村美保[1]，　小栁　喬[2]，　眞岡孝至[3,4]，新藤一敏[5]，三沢典彦[1]（[1]石川県大生資研，[2]石川県大食品科，[3]生産開発研，[4]石川県大，[5]日本女子大家政）

## C26 会場　午前の部（9:20～12:00）

微生物―物質生産－酵素，タンパク質―

**a01～a05 発表者の接続時間 9:10～9:20**

**2C26a01　Overexpression of *Chamberlinius hualienensis* hydroxynitrile lyase in *Pichia pastoris* by co-expression of protein disulfide isomerase**
**9:20**　◦Zhenyu ZHAI[1,2]，Yasuhisa ASANO[1,2]（[1]Toyama Pref. Univ., Biotech. Res. Center & Dept. Biotech, [2]ERATO, JST）

**2C26a02　*Pichia pastoris* 発現系を用いた在来ヤスデ由来ヒドロキシニトリルリアーゼの発現**
**9:35**　◦河西文武[1,2]，　Zhenyu Zhai[1,2]，　山口拓也[1,2]，　浅野泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ，[2]JST ERATO）

**2C26a03　膵島分離に用いる *Clostridium histolyticum* 由来の臨床用組換え活性型 clostripain の調製**
**9:50**　◦前田　浩[1]，村山和隆[2]，渡邉君子[3]，後藤昌史[4]，山形洋平[1]（[1]東京農工大応生化，[2]東北大院医工学，[3]東北大学未来科学技術共同研究センター，[4]東北大院医・移植再生医学）

**2C26a04　黄麹菌のクチナーゼホモログ遺伝子導入株の作製と酵素の性質**
**10:05**　◦小海克憲，前橋健二，柏木　豊（東京農大院・醸造）
**2C26a05　組換え氷核タンパク質の発現とその氷核活性について**
**10:20**　◦出原信大，桑原慎子，鈴木伸吾，藤川清三，荒川圭太（北大農）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**2C26a06　*Devosia riboflavina* の二成分型フラビン依存性モノオキシゲナーゼによるリボフラビンの分解**
**10:45**　◦金沢拓史，桝尾俊介，高谷直樹（筑波大・生命環境）
**2C26a07　環状イソマルトオリゴ糖は *Paenibacillus* sp. 598K 由来 GH family 66 デキストラナーゼの生産に 関与する**
**11:00**　◦水島大貴[1]，　宮崎剛亜[2]，　木村啓太郎[1]，　木村淳夫[3]，北村進一[4]，原博　博[3]，舟根和美[1]（[1]農研機構食研，[2]静大グリーン研，[3]北大院農，[4]大阪府大院・生命環境）
**2C26a08　アルカリ耐性を示す α-1,3-グルカン資化性菌の分離**
**11:15**　◦矢野成和[1]，大橋　陽[1]，スヨータワサナ[2]　([1]山形大院理工，[2]ソンクラー大農）
**2C26a09　*Enterococcus phoeniculicola* 由来の cellobiose-2-epimerase の精製と諸性質の検討**
**11:30**　◦三野耕平，　ヨッソムバットアッカラピモン，　高田悟郎（香大農）
**2C26a10　*Vibrio parahaemolyticus* のキチン利用におけるキチン由来オリゴ糖の役割**
**11:45**　◦大久保学[1]，平野貴子[2]，袴田　航[1,2]，西尾俊幸[1,2]([1]日大院生資科，[2]日大生資科）

## C26 会場　午後の部（14:00〜18:20）

微生物―物質生産－微生物変換，微生物酵素反応―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**2C26p01　組換え大腸菌におけるエチレングリコールを原料としたグリオキシル酸合成経路の構築**
**14:00**　◦山下岳士，山田美和，下飯　仁，礒部公安（岩大農）
**2C26p02　*Ochrobactrum* sp. AIU 033 由来アルコール酸化酵素の高機能化**
**14:15**　◦松村健児，山田美和，西山賢一，下飯　仁，礒部公安（岩大農）
**2C26p03　補酵素再成系を利用したテトラヒドロクルクミンの効率的酵素生産**
**14:30**　◦豊田拓生，橋本義輝，熊野匠人，小林達彦（筑波大院 生命環境）
**2C26p04　*Thermus thermophilus* HB8 由来ニコチンアミダーゼの同定と機能解析**
**14:45**　◦谷口博範，サングゥワンレックサティダポーン，チョチュワンパチャリン，岡野憲司，本田孝祐（阪大・院・工・生命先端）
**2C26p05　アーキアのイソプレノイド合成能を利用した炭化水素生産**
**15:00**　◦佐藤喬章[1,3]，　福家　翼[1]，　JHA Savyasachee[1]，TANSENGCO Myra[2]，跡見晴幸[1,3]（[1]京大工，[2]Industrial Technology Development Institute，[3]JST, CREST）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**2C26p06　*Kocuria-E. coli* シャトルベクターの開発およびキラル化合物生産への応用**
**15:25**　◦戸田　弘[1]，小栁　喬[2]，榎本俊樹[2]，伊藤伸哉[1]（[1]富山県大・生工研セ，[2]石川県大・生資環）
**2C26p07　プロピオン酸およびコハク酸を用いたポリヒドロキシ酪酸／ポリヒドロキシ吉草酸の蓄積量および比の制御**
**15:40**　◦戎崎優子，前田理久（明治大）
**2C26p08　酵素法によるイミダゾールジペプチドの生産**
**15:55**　◦駒林卓磨，橋田紋佳，紫牟田ひな子，木野邦器（早大理工・応化）
**2C26p09　枯草菌の NRPS 合成酵素を用いたアミド化合物の合成**
**16:10**　◦安部智子[1]，　橋本義輝[2]，　杉本さやか[2]，　小林健太[1]，熊野匠人[2]，小林達彦[2]（[1]東電大・理工，[2]筑波大院・生命環境）
**2C26p10　脂肪酸アシル-AMP 合成酵素を利用した脂肪酸アミド合成**
**16:25**　◦鈴木　伸[1]，平井健吾[1]，原良太郎[2]，木野邦器[1,2]（[1]早大・先進理工・応化，[2]早大・理工研）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**2C26p11　*Rahnella* sp. Y77 によるピロガロールの酵素合成**
**16:50**　◦大江史花[1]，岡村佳樹[1]，満倉浩一[2]，吉田豊和[2]（[1]岐阜大院・工・生命工，[2]岐阜大・工・化生工）
**2C26p12　微生物電気化学法による空気中の窒素からのアンモニア生産**
**17:05**　◦滝沢宏次，高妻篤史，渡邉一哉（東薬大生命）
**2C26p13　酵素法によるヒドロキシリジンの製法開発**
**17:20**　◦原良太郎[1]，　林　拓人[2]，　三宅良磨[3,4]，　川端　潤[3,4]，木野邦器[1,2]（[1]早大・理工研，[2]早大理工・応化，[3]三菱化学科学技術研究センター，[4]エーピーアイコーポレーション）
**2C26p14　芳香族アミン生産大腸菌の創生と発酵生産の効率化**
**17:35**　◦川﨑志慧，桝尾俊介，皆川　一，高谷直樹（筑波大生命環境）
**2C26p15　リパーゼ触媒を用いた酸化型光学活性 zerumbone の立体選択的合成**
**17:50**　◦川村彩夏，宇高芳美，北山　隆（近畿大院・農・バイオ）
**2C26p16　藍藻によるラズベリーケトンの不斉還元**
**18:05**　◦山中理央[1]，小西　徹[2]，村上まり[2]，北山　隆[2]（[1]姫路獨協大薬，[2]近畿大農・バイオ）

## J27 会場　午前の部（9:20〜12:00）

環境科学・バイオマス利用
―環境保全，浄化技術工学，バイオレメディエーション―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**2J27a01　組み換えラッカーゼによる PCB 分解の検討**
**9:20**　◦泉　咲綾[1]，　青澤理恵[1]，　家藤治幸[1]，　原富次郎[2]，高塚由美子[3]，渡辺誠也[1,4]([1]愛媛大農，[2]京都府立医科大院，[3]京都高度技術研究所，[4]愛媛大 CMES）
**2J27a02　変異型ビフェニルジオキシゲナーゼを用いた PCB 分解特性改変の検討**
**9:35**　◦青澤理恵[1]，泉　咲綾[1]，原富次郎[2]，高塚由美子[3]，渡辺誠也[1,4]（[1]愛媛大農，[2]京都府立医科大院，[3]京都高度技術研，[4]愛媛大 CMES）
**2J27a03　Biodegradation of phenolic compounds by *Bacillus licheniformis* strain TAB7**
**9:50**　◦Enock Mpofu[1]，Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1]，Felipe VEJARANO[1]，Joydeep CHAKRABORTY[1]，　Toshiaki KIMURA[2]，　Kazunori OKADA[1]，Hideaki NOJIRI[1]（[1]The Univ. of Tokyo，[2]Toyota Biotech. & Afforestation Lab., Toyota Motor Corp.）
**2J27a04　スルファニル酸分解菌の単離及び特性**
**10:05**　◦近藤美咲，牛尾一利，中川克彦，早瀬伸樹（新居浜高専生物応化）
**2J27a05　シャペロニン GroES/EL による CarBaBb 酵素複合体の会合様式の解明**
**10:20**　◦山本寛樹，岩田健一（芝工大院シ）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**2J27a06　Diversity of carbazole degradative gene clusters, mobilization and recruitment according to whole genome sequencing**
**10:45**　◦Felipe VEJARANO[1]，Joydeep CHAKRABORTY[1]，Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1]，Yu KANESAKI[2]，Hirofumi YOSHIKAWA[2]，Kazunori OKADA[1]，Hideaki NOJIRI[1]　([1]The Univ. of Tokyo，[2]Tokyo Univ. of Agriculture）
**2J27a07　*Rhodococcus erythropolis* PR4 株を用いた微生物細胞**

入り有機溶媒ミセル液の炭化水素の分解への有用性
**11:00** ○田上晃二，牧　紘平，岩淵範之，砂入道夫（日大・生資科・応生科）

**2J27a08　*Rhodococcus erythropolis* PR4 のアルカンとの相互作用に対する $MgSO_4$の影響**
**11:15** ○田淵大樹[1]，瀧原速仁[2]，岩淵範之[1]，砂入道夫[1]（[1]日大・生資科・応生科，[2]新潟大院・医）

**2J27a09　Gene expression analysis of aerobic and anaerobic benzene degradative genes of *Azoarcus* sp. DN11**
**11:30** ○Allan DEVANADERA[1]，Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1]，Yuki KASAI[2]，Yoh TAKAHATA[3]，Kazunori OKADA[1]，Hideaki NOJIRI[1]（[1]The Univ. of Tokyo, [2]Chuo Univ., [3]Taisei Corp.）

**2J27a10　微生物捕食による汚泥減容の試みと *de novo* メタトランスクリプトーム解析による分子基盤の解明**
**11:45** ○佐藤由也，堀　知行，ナバロロナルド，長縄竜一，尾形　敦，羽部　浩（産総研・環境管理）

## J27 会場　午後の部（14:00〜18:20）

環境科学・バイオマス利用
―環境保全，浄化技術工学，バイオレメディエーション―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**2J27p01　環境汚染物質ビフェニルから PHA への効率的変換のための基盤づくり**
**14:00** ○矢島泰斗，前田理久（明治大学）

**2J27p02　土壌・マングローブ底泥由来の微生物におけるピレン分解系の解析**
**14:15** ○森田知美[1]，ベハラノフェリペ[2]，水口千穂[2]，ワナパイサンパガクロン[3]，ラオタンティーブナッタリガ[4]，ムアンチンダチャノクポーン[4]，岡田憲典[2]，ピンヤコンオルタイ[4]，岩田健一[1]，野尻秀昭[2]（[1]芝工大院シ，[2]東大生セ，[3]マヒドン大学，[4]チュラロンコーン大学）

**2J27p03　化学窒素肥料の効率的利用に向けたカビ脱窒阻害剤のスクリーニング**
**14:30** ○松岡真生[1]，Ashutosh Kumar[2]，Muhammad Muddassar[2]，松山晃久[1,3]，Kam Y. J. Zhang[2]，吉田　稔[1,3,4]（[1]理研・CSRS・ケミカルゲノミクス研究グループ，[2]理研・ライフサイエンス技術基盤研究センター，[3]理研・化学遺伝，[4]科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業）

**2J27p04　Burkholderia sp. KU-46 株による 4-ニトロ安息香酸および 4-アミノ安息香酸の分解**
**14:45** ○田川須美，岩木宏明，長谷川喜衛（関西大化学生命工）

**2J27p05　北海道の黒ボク土壌からなる高 $N_2O$ 放出圃場より難培養性 $N_2O$ 放出細菌及び $N_2O$ 消去細菌の探索**
**15:00** ○高津祐太，橋床泰之（北大農）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**2J27p06　2.5%NaCl 負荷における生物膜と包括担体を併用した SNAP 法による窒素除去の試み**
**15:25** ○海老根会，角野立夫，高品知典（東洋大院生命）

**2J27p07　作業現場を想定した簡便な蛍光誘導体化反応条件による芳香族アミンの高選択的分析法の開発**
**15:40** ○井上直子（労働者健康安全機構 安衛研）

**2J27p08　微生物を利用した新規汚泥減容化システム**
**15:55** ○柳瀬亜美[1]，杉村寿將[1]，黒住　悟[2]，石田秀樹[2]，倉根隆一郎[1]（[1]中部大学，[2]積水アクアシステム㈱）

**2J27p09　細胞性粘菌の持つ線虫忌避効果について**
**16:10** ○白神美菜子[1]，永松ゆきこ[2]，齊藤玉緒[3]（[1]上智大院・理工，[2]パネフリ工業株式会社，[3]上智大・理工）

**2J27p10　農地土壌環境の特性解析および環境改善方法の検討**
**16:25** ○山崎　透，荒木希和子，久保　幹（立命大生命）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**2J27p11　有機資材中で増殖させた炭化水素分解菌を用いたバイオレメディエーション**
**16:50** ○川村瑞穂，荒木希和子，久保　幹（立命大生命）

**2J27p12　Utilization of waterweed to improve the quality of aquatic environment**
**17:05** ○Lutfi NIMATUS SALAMAH，Takuji HANASHIRO，Kiwako S. ARAKI，Motoki KUBO（Ritsumeikan Univ.）

**2J27p13　Evaluation of a new water treatment system in a natural water environment**
**17:20** ○Ima Yudha Perwira，Kiwako S Araki，Motoki Kubo（Fac. Life Sci., Ritsumeikan Univ.）

**2J27p14　閉鎖系水域における有用微生物群による水質浄化と環境影響の評価**
**17:35** ○三木翔平，伊藤秋実，山本真輝，坂上吉一，森　美穂（近大農）

**2J27p15　地球温暖化により消滅の危機にあるサンゴ礁の修復(その 1)―Redox nanoparticle による高温ストレス下でのサンゴ幼生の生存率の向上―**
**17:50** ○元根啓佑[1]，高木俊幸[1,2]，油屋駿介[1,2]，新里宙也[3]，長崎幸夫[4]，竹山春子[5]，青木　航[1]，植田充美[1]（[1]京大院農，[2]日本学術振興会特別研究員，[3]OIST，[4]筑波大院数理物質，[5]早稲田大理工）

**2J27p16　高原野菜における環境保全型二毛作を目指した好熱菌発酵産物の効果検証**
**18:05** ○新海一禎[1]，原田真梨子[2,3]，平田敏章[2,3]，仲島圭亮[2,3]，姜　赫[2,3]，宮本浩邦[4,5]，原田　徹[2,3]（[1]新海農園，[2]原田アグロビジネス，[3]サプリーナファーム，[4]サーマス，[5]千葉大・融合）

## J28 会場　午前の部（9:20〜12:00）

環境科学・バイオマス利用―資源変換，資源再生利用―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**2J28a01　レアメタルの持続可能な利用を目的とした酵母によるモリブデンの選択的回収・濃縮システムの構築**
**9:20** ○池田直也[1]，簡　梅芳[1]，久保田健吾[2]，井上千弘[1]（[1]東北大院・環境，[2]東北大院・工）

**2J28a02　海洋生物から分離された好気性セレン酸還元菌の諸性質**
**9:35** ○阪口利文[1,2]，田中星奈[1]，馬越智也[2]，岡村好子[3]，石川　輝[4]，田口和典[4]（[1]県立広島大生命科，[2]県立広島大環境科，[3]広島大院先端物質，[4]三重大院生物資源）

**2J28a03　ジスプロシウムを固化蓄積する好酸性真菌 *Penidiella* sp. T9 株の分離および特徴解析**
**9:50** ○堀池　巧[1]，清野　肇[2]，山下光雄[1,2]（[1]芝浦工大，SIT 総研，レアメタルバイオリサーチセンター，[2]芝浦工大，工）

**2J28a04　沈水植物オオカナダモ(*Egeria densa*)のマンガン集積には付着微生物が関与している**
**10:05** ○原田英美子，辻　康介，沢田美由紀，長谷川博（滋賀県大環境科学）

**2J28a05　地下環境褐炭由来の微生物群を用いた嫌気条件下での腐植物質分解**
**10:20** ○上野晃生[1]，玉村修司[1]，荒牧憲隆[1]，重吉八郎[2]，福嶋正巳[3]，長沼　毅[4]，金子勝比古[1]（[1]幌延地圏環境研究所，[2]三菱マテリアル株式会社，[3]北大院・工学研究院，[4]広島大院・生物圏科学）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**2J28a06　燻炭により生育が促進する微生物の探索と抗真菌活性の比較**
**10:45** ○江邉正平，大池達矢，岡南政宏，阿野貴司（近大院生物理工）

**2J28a07　Phanerochaete chrysosporium における aldo-keto 還元酵素 AKR1**

**11:00** ○井本篤志[1]，　栗山和也[1]，　阪本鷹行[2]，　左近静香[3]，泉津弘佑[1]，鈴木一実[1]，入江俊一[1]（[1]滋県大環，[2]徳大生資，[3]京大生存）

**2J28a08　放射能汚染牛の好気性高温発酵処理堆肥を用いたイネ科植物の栽培**

**11:15** ○吉井貴宏，矢野紘子，古井義博，森屋利幸，大島泰郎（共和化工・環境微生物研）

**2J28a09　Value added cocompost of oil palm harbored with multifunctional bacteria beneficial to industry**

**11:30** ○Clament CHIN[1]，Yoshihide FURUYA[1]，Yukihiro TASHIRO[1]，Yoshihito SHIRAI[2]，Mohd. Huzairi MOHD. ZAINUDIN[3]，Nurhayati RAMLI[3]，Mohd. Ali HASSAN[3]，Kenji SAKAI[1]（[1]Kyushu Univ.，[2]Kyushu Instit. Technol.，[3]Univ. Putra Malaysia）

**2J28a10　美容素材としてのオリーヴ樹皮の可能性について**

**11:45** ○岸本憲人（小豆島ヘルシーランド株式会社オリーヴ健康科学研究所）

## J28 会場　午後の部（14:00〜18:20）

環境科学・バイオマス利用
―バイオマス，バイオマス変換，バイオ燃料，バイオ化成品―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**2J28p01　「大気窒素」を活用する次世代型発酵：窒素固定細菌による「廃グリセロール」の再資源化**

**14:00** ○吉田暢広[1]，菅原良実[2]，南部優子[3]，村田幸作[4]，橋本　渉[1,3]（[1]京大・農，[2]京都市・環境政策局，[3]京大院・農，[4]摂南大・理工）

**2J28p02　有機質資材の無機化定量技術の構築**

**14:15** ○奥田秀樹，荒木希和子，久保　幹（立命大・生命）

**2J28p03　ユーグレナのワックスエステル発酵において溶存無機炭素が担う役割の解明**

**14:30** ○小川拓水[1]，Padermshoke Adchara[1]，西尾和樹[1]，中澤昌美[1]，中本雅俊[1,2]，岡澤敦司[1]，金谷重彦[2]，有田正規[3,4]，太田大策[1]（[1]阪府大院・生命環境，[2]奈良先端大院・情報，[3]遺伝研・生命情報，[4]理研・環境資源）

**2J28p04　バイオ燃料生産に向けた耐塩性緑藻の進化工学的育種と塩ストレス耐性による油脂生産低下メカニズムの解明**

**14:45** ○加藤悠一[1]，　賀　詩欣[2]，　張　嘉修[3]，　蓮沼誠久[1]，近藤昭彦[1]（[1]神戸大，[2]ハルビン工業大，[3]国立成功大）

**2J28p05　緑藻 *Boryococcus braunii* のトリテルペン炭化水素合成酵素の出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いた機能解析**

**15:00** ○池田美咲[1]，　三井菜々香[1]，　竹田綾女[1]，　野口哲子[1]，岡田　茂[2]，鍵和田聡[1]（[1]奈女大理，[2]東大農）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**2J28p06　*Clostridium cellulovorans* および *Clostridium beijerinckii* 共培養によるシュガービートパルプからの酪酸生産**

**15:25** ○富田寿男[1]，　川出雄二郎[1]，　岡崎文美[1]，Lopez-Contreras Ana M.[2]，田丸　浩[1,3,4]（[1]三重大院・生物資源，[2]Wageningen UR・Food Biobased Res.，[3]三重大・生命支セ，[4]三重大・新産業）

**2J28p07　*Ruminiclostridium josui* の RjCel5B または RjXyn10C と全長骨格タンパク質との複合体形成と活性の比較**

**15:40** ○織田　拓，粟冠真紀子，木村哲哉，粟冠和郎（三重大学）

**2J28p08　Adsorption and desorption of carbohydrate-binding modules in Trichoderma Reesei Cel7A**

**15:55** ○Xu FANG，Baojie Jiang，Dan Feng，Suhao Niu（Shandong Univ.）

**2J28p09　*Schizophyllum commune* 変異株を用いた糖化発酵同時進行によるリグノセルロースからの直接 L-リンゴ酸生産**

**16:10** ○星野一宏[1]，高野真希[1]，畑下昌範[2]（[1]富大理工，[2]若狭エネ研）

**2J28p10　アカテガニ類が示すバイオマス分解活性の解析**

**16:25** ○三宅克英，知田真之介，裏　佳織，馬場保徳（石川県大資源研）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**2J28p11　酵母 *Saccharomyces cerevisiae* へのセルラーゼ生産能の付与**

**16:50** ○松崎浩明，山凪新平，上田賢一，秦野琢之　（福山大生命工）

**2J28p12　同時糖化併行複発酵プロセスにおけるセルロース系エタノール生産のためのペントースリン酸経路遺伝子発現の最適化**

**17:05** ○小林洋介，佐原健彦，扇谷　悟，鎌形洋一，藤森一浩（産総研・生物プロセス）

**2J28p13　高効率セルロース系エタノール生産に適した遺伝子組換え出芽酵母のデザイン**

**17:20** ○藤森一浩，小林洋介，佐原健彦，扇谷　悟，鎌形洋一（産総研・生物プロセス）

**2J28p14　イオンビーム変異誘導法による耐熱性乳酸生産糸状菌の Xylose 代謝向上**

**17:35** ○高野真希[1]，山下聖樹[1]，畑下昌範[2]，星野一宏[1]（[1]富山大院理工，[2]若狭湾エネ研）

**2J28p15　細胞内レドックスバランスを維持できるキシロース資化酵母の性能向上**

**17:50** ○佐々木勇輔[1,2,3]，高木俊幸[2,3]，元根啓佑[2,3]，黒田浩一[2,3]，植田充美[2,3]　（[1]京大院・総合生存，[2]京大院農・応用生命，[3]JST, CREST）

**2J28p16　Target-AID を利用したゲノム編集による高収率ブタノール発酵性クロストリジウム属微生物の育種**

**18:05** ○向山正治[1]，　市毛栄太[1]，　田中　勉[2]，　西田敬二[2]，近藤昭彦[2]（[1]株式会社日本触媒，[2]神戸大学）

## J29 会場　午前の部（9:20〜12:00）

生物科学―糖鎖科学－構造，糖鎖科学－機能―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**2J29a01　ビオチン化コンドロイチン硫酸オリゴ糖の合成**

**9:20** ○上村明寿美[1]，　松下健也[2]，　中田有美[1]，　武田-奥田尚子[1]，田村純一[1,2]（[1]鳥取大地域，[2]鳥取大院工）

**2J29a02　野生のニホンジカ鹿茸に含まれるコンドロイチン硫酸の分析**

**9:35** ○三谷真鈴，　植村優那，　大村優華，　谷　明里，武田-奥田尚子，田村純一（鳥取大地域）

**2J29a03　異なる生息環境下での鹿茸に含まれるコンドロイチン硫酸の比較分析**

**9:50** ○武田-奥田尚子[1]，　全　炳台[2]，　李　致鎬[3]，　金　守基[3]，田村純一[1]（[1]鳥取大地域，[2]建国大動物生命，[3]建国大医療生命）

**2J29a04　Identification of UDP sialyl N-acetyllactosamine in colostrum of addax, an antelope species**

**10:05** ○Ganzorig Khuukhenbaatar[1]，Masashi Sasaki[1]，Takuya Asakawa[2]，Kenji Fukuda[1]，Tadasu Urashima[1]（[1]Obihiro Univ.，[2]Himeji Central Park）

**2J29a05　希少糖 6-デオキシアルトロースを含む N-結合型糖鎖の発見**

**10:20** ○長束俊治[1,2]，半澤　健[2]，田幸正邦[3]，石田秀治[4]（[1]新潟大理，[2]新潟大院自然，[3]琉球大健康長寿科学研，[4]岐阜大応用生物）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**2J29a06　生息環境の異なる魚類に含まれるコンドロイチン硫酸の分析**

**10:45** ○田村純一，上田健人，武田-奥田尚子（鳥取大地域）

**2J29a07　マルトトリオース生成アミラーゼの糖転移活性を用いた *p*-ニトロフェノール配糖体の合成**

**11:00** ○殘華智子，川口剛司，炭谷順一，谷　修治　（阪府大院生還）

**2J29a08　ニワトリ雄性生殖巣における CD52 様タンパク質の発見**

**11:15** ○北島　健[1,2]，　鈴木英里子[1,2]，　木下圭司[3]，　大森保成[3]，宮田真路[2]，佐藤ちひろ[1,2]（[1]名大生物機能セ，[2]名大院生命農学，[3]名大鳥類バイオセ）

**2J29a09　病原性真菌 *Cryptococcus neoformans* は EGCrP2 によって免疫賦活糖脂質を分解することで宿主免疫系から逃避する**

**11:30** ○渡辺　昂[1]，　藤田実花[1]，　今井崇史[2]，　永田雅大[2]，谷　元洋[3]，　本田智美[1]，　角田佳充[1]，　石橋洋平[1]，　沖野　望[1]，山崎　晶[2]，伊東　信[1]（[1]九大院・農・生命機能，[2]九大・生医研・分子免疫，[3]九大院・理・生体情報化学）

**2J29a10　養殖ヒトエグサから分離したラムナン硫酸の抗血液凝固活性**

**11:45** ○田幸正邦[1,2]，山城陽一[1]，上地俊徳[1]（[1]琉球大農，[2]健康長寿科学研）

## J29 会場　午後の部（14:00〜18:20）

### 生物科学―糖鎖科学－機能，糖鎖科学－その他―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**2J29p01　ヒトゴルジ体 β-ガラクトシダーゼの発見と *N*-結合型糖鎖修飾との関係**

**14:00** ○三浦一輝[1]，　青山結郁[2]，　夏夕利加[2]，　袴田　航[1,2]，平野貴子[2]，西尾俊幸[1,2]（[1]日大院生資科，[2]日大生資科）

**2J29p02　抗体糖鎖リモデリングに向けた EndoS2 D182X 変異体の解析**

**14:15** ○高島　晶[1]，　大隅賢二[1]，　月村　亘[1]，　森　昌子[1]，黒河内政樹[1]，　菅原州一[1]，　高柳　淳[2]，　水野真盛[1]，　松田昭生[1]，天野純子[1]，白井　孝[1]（[1](公財)野口研，[2]慶応大先導研 GSP）

**2J29p03　Native な糖タンパク質のアスパラギン結合コンプレックス型糖鎖特異的糖鎖遊離酵素の存在様式とその性質**

**14:30** ○伊藤和央，高谷尚弥，竹内朋史（阪市大院・理）

**2J29p04　*In vitro* 発現系を利用した Glycoside Hydrolase Family 47 の蛋白の調製**

**14:45** ○相川順一，伊藤幸成(理研)

**2J29p05　植物細胞壁ペクチン成分ラムノガラクツロナン I の生合成に関与するラムノース転移酵素の同定**

**15:00** ○加藤耕平[1]，　竹中悠人[1]，　鶴浜和奈[1]，　柳生健太[1]，竹田篤史[1]，　國枝　正[2]，　西村いくこ[2]，　小川(大西)真理[3]，松林嘉克[3]，石水　毅[1]（[1]立命館大生命，[2]甲南大理工，[3]名大院理）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**2J29p06　遊離 N-グリカンのタンパク質フォールディング促進活性とアミロイド形成阻害活性**

**15:25** ○勝部　諒[1]，　阿部義人[2]，　前田　恵[1]，　田中達也[1]，植田　正[2]，木村吉伸[1]（[1]岡山大院・環境生命，[2]九大院・薬学府）

**2J29p07　酸性 PNGase 遺伝子を完全にノックアウトした *A.thaliana* 中の PNGase 活性と遊離 *N*-グリカンの構造特性**

**15:40** ○上村亮太[1]，　前田　恵[1]，　秋山　剛[1]，　三﨑　亮[2]，藤山和仁[2]，木村吉伸[1]（[1]岡大院環境生命，[2]阪大国際交流セ）

**2J29p08　Diverse subcellular localization of the insect CMP-sialic acid synthetases**

**15:55** ○Di Wu[1,2,3]，　Akiko Fujita[1]，　Chihiro Sato[1,2,3]，Ken Kitajima[1,2,3]（[1]Nagoya Univ. BBC，[2]Nagoya Univ. Grad. Sch. Bioagr. Sci.，[3]Nagoya Univ. IGER-GNS）

**2J29p09　大腸菌膜タンパク質の膜挿入機構解明に向けた糖脂質 MPIase 部分構造の合成**

**16:10** ○藤川紘樹[1]，西山賢一[2]，島本啓子[1]（[1](公財)サントリー生有研，[2]岩手大農）

**2J29p10　化学合成標品を用いたタンパク質膜挿入に関与する糖脂質酵素 MPIase の構造と機能の解析**

**16:25** ○池田汐里[1]，藤川紘樹[2]，島本啓子[2]，西山賢一[1]（[1]岩手大学，農学部，[2]サントリー生命科学財団，生物有機科学研究所）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**2J29p11　TFA 感受性保護基を用いたシアリル糖ペプチドの合成**

**16:50** ○竹田直樹，武居俊樹，朝比奈雄也，北條裕信　（阪大蛋白研）

**2J29p12　直行型チオエステル化素子を利用したヒトヒストン H4 の化学合成**

**17:05** ○朝比奈雄也，川上　徹，北條裕信（阪大蛋白研）

**2J29p13　非天然型シアニジン配糖体の合成および抗酸化能の評価**

**17:20** ○吉村弥生，齋藤隆行，松尾一郎（群馬大院理工）

**2J29p14　リゾホスファチジルグルコシドの合成研究**

**17:35** ○松尾一郎，大山純平，齊藤祥吾，鈴木靖明，吉村弥生（群馬大院理工）

**2J29p15　脱離基中にアルデヒドを持つチオグリコシド型糖供与体の反応挙動**

**17:50** ○堺　英俊[1]，小室晴香[2]，西田芳弘[1,3]，土肥博史[2,3]（[1]千葉大院融合，[2]千葉大院園芸，[3]千葉大・分子キラリティー研究センター）

**2J29p16　チオサリチル酸メチルグリコシドを用いたマンノシル化に関する研究**

**18:05** ○佐々木リサ[1]，　大野勇次[2]，　西田芳弘[1,3]，　土肥博史[2,3]（[1]千葉大院融合，[2]千葉大院園芸，[3]千葉大・分子キラリティー研究センター）

## J30 会場　午前の部（9:20〜11:45）

### 植物―タンパク質，酵素－機能，調節―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**2J30a01　ダイズ ERO1a は分子内ジスルフィド結合の還元により活性が制御される**

**9:20** ○松崎元紀，　成尾由理香，　廣瀬明歩，　奥田　綾，小石原克典，増田太郎，裏出令子（京大院農・農学）

**2J30a02　GmERO1a の基質特異性および活性型へのスイッチングとダイズ PDI ファミリーとの関係**

**9:35** ○河野慧一，松崎元紀，廣瀬明歩，土雄一朗，成尾由理香，奥田　綾，増田太郎，裏出令子（京大院農・農学）

**2J30a03　複合体を形成する複数のダイズ PDI ファミリーによる協調的なタンパク質フォールディング**

**9:50** ○奥田　綾，松崎元紀，河野慧一，土雄一朗，廣瀬明歩，増田太郎，裏出令子（京大院農・農学）

**2J30a04　ブドウ由来ミラクリン類似タンパク質の構造解析**

**10:05** ○井深章子，大倉宗一郎，堀実佐穂，古川那由太（新潟薬大・応生科）

**2J30a05　植物由来ミモシナーゼの反応機構及びシスタチオニン β-リアーゼとの分子進化的関係の解明**

**10:20** ○大貝茂希[1]，福田雅一[2]，渡邊啓一[4]，屋　宏典[3]（[1]鹿児島大学，[2]琉球大農，[3]琉球大熱生研，[4]佐賀大学）

**a06〜a09 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**2J30a06　日本型イネ由来の新規除草剤抵抗性遺伝子 *HIS1* の機能解析**

**10:45** ○戸澤　譲[1]，　泉　厚志[2]，　武井里美[1]，　山崎明彦[3]，関野景介[3]，　山田祐司[3]，　村田和優[4]，　前田英郎[5]，　廣瀬咲子[6]，川岸万紀子[6]，谷口洋二郎[6]，川田元滋[6]，吉田　均[6]，大島正弘[6]，加藤　浩[7]（[1]埼玉大院理工，[2]富山県大，[3]株)エス・ディー・エス　バイオテック，[4]富山県・農林水産総合技術センター，[5]農研機構・中央研，[6]農研機構・生物機能部門，[7]農研機構・作物開発センター）

**2J30a07　イネ由来の除草剤抵抗性遺伝子がコードする HIS1 タンパク質の機能解析**

**11:00** ○武井里美[1]，　泉　厚志[2]，　山崎明彦[3]，　関野景介[3]，山田祐司[3]，　谷口洋二郎[4]，　川田元滋[4]，　吉田　均[4]，　大島正弘[4]，戸澤　譲[1]（[1]埼玉大院理工，[2]富山県大，[3]株)エス・ディー・エス　バイオテック，[4]農研機構・生物機能部門）

**2J30a08　Screening of extracts prepared from Okinawan natural resources for neuraminidase inhibitory activity**

**11:15** ○Hiroshi TANAKA[1]，　Chinen Koki[1]，　Uehara Chisaki[1]，Minei Mieko[2]，Minei Masahide[2]（[1]NIT, Okinawa College，[2]Ai leaf）

**2J30a09　細胞質分裂期における C24 エチルステロールが担う生理機能解明**

**11:30** ○山六祐果[1]，中本雅俊[1,2]，金谷重彦[2]，太田大策[1]（[1]大府大生命，[2]奈良先端情報）

## J30 会場　午後の部（14:00〜18:20）

生物科学―生物工学－酵素工学・生物反応工学，生物工学－生物材料工学，生体医用工学―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**2J30p01　超好熱菌由来 Thermococcus kodakarensis 由来 subtilisin 様プロテアーゼとその利用**
**14:00** ○古賀雄一，清水七海，足立航平（阪大工）

**2J30p02　ケラチン分解酵素の機能未知 β サンドイッチドメインの機能解析**
**14:15** ○杉田愼之助，大政健史，古賀雄一（阪大工）

**2J30p03　様々な構造のタンパク質に対する新規な可溶性発現に関わるアミノ酸残基予測法の検討**
**14:30** ○篠田　優[1,2]，松井大亮[1,2]，浅野泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ，[2]JST ERATO）

**2J30p04　N 末端融合ペプチドを用いた新規可溶性発現検出法**
**14:45** ○元島史尋[1,2]，浅野泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ，[2]JST, ERATO）

**2J30p05　新規環状ペプチドの開発に向けたラジカル SAM 酵素 QhpD の基質特異性解析**
**15:00** ○小酒井一輝，中井忠志，谷澤克行，岡島俊英（阪大産研）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**2J30p06　チロシナーゼを用いたテアフラビン合成反応の特異性**
**15:25** ○奈良井朝子，川島　彩，内田有香，川村美穂，中山　勉（日獣大 応生科）

**2J30p07　ヒト由来糖転移酵素の共発現によるカイコ発現エリスロポエチンの *N* 型糖鎖構造改変**
**15:40** ○堀場早紀[1]，　加子夏未[1]，　宮崎剛亜[1,2]，　加藤竜也[1,2]，近藤幸子[3,4]，加藤晃一[3,4,5]，矢木宏和[3]，朴　龍洙[1,2]（[1]静大院・農，[2]静大グリーン科技研，[3]名市大院・薬，[4]株式会社医学生物学研究所，[5]自然科学研究機構・岡崎統合バイオ）

**2J30p08　PET 分解酵素クチナーゼの基質結合モデルと高機能化**
**15:55** ○織田昌幸[1]，川端　猛[2]，河合富佐子[3]（[1]京府大院生環科，[2]阪大蛋白研，[3]京工繊大繊科セ）

**2J30p09　C-terminal truncation improved the enzyme stability of recombinant hydroxynitrile lyase from *Passiflora edulis* expressed in *Escherichia coli***
**16:10** ○Aem NUYLERT[1]，Yasuhisa ASANO[1,2]（[1]Biotechnology Research Center, Toyama Prefectural Univ., [2]Asano Active Enzyme Molecule Project, ERATO, JST）

**2J30p10　指向性進化による転写因子 XylS のリガンド認識能の改変**
**16:25** ○小川友希[2]，勝山陽平[1]，上野堅登[2]，大西康夫[1]　([1]東大院・農生科・応生工，[2]東大農・生命化学工学）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**2J30p11　タンパク質進化経路における安定性の役割**
**16:50** ○倉橋　亮，佐野　智，高野和文（京府大院）

**2J30p12　円石藻 *Pleurochrysis carterae* に対する Ca, P の石灰化への影響**
**17:05** ○新井真子[1]，関　和輝[1]，長坂征治[1,2,3]（[1]東洋大 生命科学，[2]東洋大院 生命科学，[3]東洋大学生命環境科学研究センター）

**2J30p13　Identification of the proteins involved in tooth mineralization in the giant pacific chiton, *Cryptochiton stelleri* by transcriptome and proteome analysis**
**17:20** ○Michiko NEMOTO[1]，Dongni REN[2]，Steven HERRERA[2]，Takashi TAMURA[1]，Kenji INAGAKI[1]，David KISAILUS[2]（[1]Okayama Univ., [2]University of California, Riverside）

**2J30p14　エレクトロスピニングを用いた抗がん剤を含有する新規徐放性担体の機能の検討**
**17:35** ○八部雄太[1]，　多田一風太[1]，　牧田昌士[2]，　坪田庄真[3]，岸田　聡[3]，西川靖俊[2]，門松健治[3]，池松真也[1]（[1]沖縄高専，[2]オルソリバース，[3]名古屋大学）

**2J30p15　遺伝子改変ヘパトーマ細胞の肝機能誘導における薬剤添加の影響**
**17:50** ○上平正道，　佐藤一輝，　トネロジェーン，　河邉佳典，井藤　彰（九大工）

**2J30p16　ポリ γ グルタミン酸イオンコンプレックス（PGAIC）の微細構造と安定性**
**18:05** ○白米優一[1]，東内遥菜[2]，芦内　誠[1,2]（[1]愛媛大連農，[2]高知大農）

## J31 会場　午前の部（9:20〜12:00）

植物― 一次代謝，二次代謝―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**2J31a01　ブンタン葉のストレス応答反応における二次代謝物質の変動解析**
**9:20** ○伊佐木芳[1]，松川哲也[1,2]，梶山慎一郎[1]（[1]近畿大院生物理工，[2]近畿大附属農場）

**2J31a02　イソキノリンアルカロイド生合成系の発現制御に関わる AP2/ERF 型転写因子群の探索**
**9:35** ○山田泰之，西田昇平，佐藤文彦（京大院生命科学）

**2J31a03　コーヒーノキからのカフェイン分泌と根圏での分解動態の解析**
**9:50** ○川上　智[1]，　永山秀佳[2]，　荻田信二郎[2]，　矢崎一史[1]，杉山暁史[1]（[1]京都大学 生存圏研究所，[2]県立広島大学 生命環境学部）

**2J31a04　土壌中の炭素，窒素量および C/N 比調節によるトマト含有成分の検討**
**10:05** ○小橋勇也[1]，　アディカリディネッシュ[2]，　荒木希和子[1]，久保　幹[1]（[1]立命大生命，[2]SOFIX 農業推進機構）

**2J31a05　種子色によるコムギのフラボノイド成分の差異**
**10:20** ○神山紀子[1]，　蝶野真喜子[1]，　中川博之[2]，　小野裕嗣[2]，松中　仁[3]（[1]農研機構作物開発センター，[2]農研機構高度解析センター，[3]農研機構九沖農研）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**2J31a06　質量分析イメージングによる葉組織内部におけるグルコシノレートの可視化**
**10:45** ○一瀬智美[1]，　村山布紗[1]，　藤村由紀[1]，　山崎雄三[2]，割石博之[1]，三浦大典[1]（[1]九大レドックスナビ，[2]島津製作所）

**2J31a07　オオムギ属植物 *Hordeum murinum* から単離されたムリナミド類の立体化学と抗菌活性**
**11:00** ○宇部尚樹[1]，上野琴巳[2]，武田　真[3]，石原　亨[2]（[1]鳥取大院・農，[2]鳥取大・農，[3]岡山大・資源植物科学研究所）

**2J31a08　重水素トレーサー法を利用したチャにおける 2-phenylethanol 生合成経路の解明**
**11:15** ○澤井伸也[1]，　阪井直哉[1]，　山下寛人[1]，　一家崇志[2]，森田明雄[2]，勝野　剛[3]，渡邉修治[4]，大西利幸[2,4,5]（[1]静大院・総合農，[2]静大農・応生化，[3]静岡県農林技研茶研センター，[4]静大院・創造，[5]静大・グリーン研）

**2J31a09　除虫菊で神経作用性化合物ピレスリンを合成する GDSL リパーゼの阻害剤の設計と結晶化**
**11:30** ○松田一彦[1]，　山崎智穂子[1]，　高松元紀[1]，　伊原　誠[1]，平竹　潤[2]（[1]近大農，[2]京大化研）

**2J31a10　ピレスリン生合成を触媒する除虫菊 GDSL リパーゼ Tc-GLIP による天然基質の構造認識**
**11:45** ○髙松元紀[1]，　山崎智穂子[1]，　伊原　誠[1]，　松尾憲忠[1,2]，松田一彦[1]（[1]近大農，[2]関学理工）

## J31 会場　午後の部（14:00〜18:20）

植物― 一次代謝，二次代謝―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**2J31p01　ペチュニア花弁で高発現する輸送体遺伝子の組織・時期特異的な発現解析**
**14:00**　°天野郁子[1]，肥塚崇男[2]，鈴木秀幸[3]，士反伸和[1]（[1]神薬大，[2]山口大・創成科学，[3]かずさ DNA 研）

**2J31p02　ジャスモン酸で誘導されるタバコ NCS1 型輸送体 T408 の機能解析**
**14:15**　°士反伸和[1]，南　翔太[1]，津山　濯[2]，グーセンスアラン[3]，鈴木秀幸[4]，林田南帆[1]，高部圭司[5]，森山芳則[6]，矢崎一史[7]（[1]神薬大，[2]宮崎大農，[3]ゲント大，[4]かずさ DNA 研，[5]京大農，[6]岡山大薬，[7]京大生存研）

**2J31p03　プラストキノン・トコフェロール生合成におけるフェノール性中間体のプラスチド取り込み輸送体の探索**
**14:30**　°棟方涼介，杉山暁史，矢崎一史（京大・生存研）

**2J31p04　チューリップにおけるチューリッポシド B 変換酵素の分子多様性：根由来アイソザイムの同定**
**14:45**　°野村泰治，上野綾香，加藤康夫（富山県大・生工研セ）

**2J31p05　トマトにおける α-トマチン生合成に関わる A 環酸化還元酵素の解析**
**15:00**　°李ヒョン宰，小林　緑，中安　大，杉本幸裕，水谷正治（神戸大院・農・生命機能科学）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**2J31p06　CRISPR/Cas9 によるジャガイモ α-ソラニン生合成遺伝子のゲノム編集**
**15:25**　°秋山遼太[1]，中安　大[1]，李　燊宰[1]，刑部敬史[2]，刑部祐里子[2]，梅基直行[3]，村中俊哉[4]，斉藤和季[5]，杉本幸裕[1]，水谷正治[1]（[1]神戸大院農，[2]徳島大院生物，[3]理研 CSRS，[4]大阪大院工，[5]千葉大院薬）

**2J31p07　サンショウ油胞特異的に蓄積する揮発性テルペンの生成に関する研究**
**15:40**　°肥塚崇男[1]，藤田芳勧[1]，飯島陽子[2]，相田光宏[3]，鈴木秀幸[4]，松井健二[1]（[1]山口大院農，[2]神奈川工科大応用バイオ，[3]奈良先大バイオサイエンス，[4]かずさ DNA 研バイオ研究開発）

**2J31p08　ホップにおけるリナロール／ネロリドール合成酵素の機能解析**
**15:55**　°影山丈士[1]，杉村　哲[2]，棟方涼介[1]，百瀬眞幸[3]，梅基直行[3]，小原一朗[3]，三沢典彦[4]，新藤一敏[5]，矢崎一史[1]（[1]京大・生存研，[2]キリン・酒類研，[3]キリン・基盤研，[4]石川県大・生資研，[5]日女大・家政）

**2J31p09　ソバ由来フラボノイド *C*-配糖化酵素の反応メカニズムの調査**
**16:10**　°小柳祐輔[1]，水藤史明[2]，新井亮一[1,3]，田口悟朗[1,3]（[1]信州大院・理工，[2]東大院・新領域，[3]信州大・繊維）

**2J31p10　ワサビ（*Wasabia japonica*）のイソサポナリン生合成に関与する *C*-配糖化酵素の同定**
**16:25**　°眞島京子[1]，鈴木秀幸[2]，田口悟朗[1,3]（[1]信大院理工，[2]かずさ DNA 研究所，[3]信大繊維）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**2J31p11　シロイヌナズナ由来ナリンゲニン 7-*O*-グルコース転移酵素の特性解析**
**16:50**　°窪村有紗，大橋貴生，長谷川友香，三崎　亮，藤山和仁（阪大生国セ）

**2J31p12　ヤマノイモ属におけるステロイドサポニン生合成の配糖化段階に関わる糖転移酵素の探索**
**17:05**　°中安　大[1]，李ヒョンゼ[1]，杉本幸裕[1]，鈴木秀幸[2]，遠城道雄[3]，村中俊哉[4]，水谷正治[1]（[1]神戸大院・農，[2]かずさ DNA 研究所，[3]鹿児島大院・農，[4]大阪大院・工）

**2J31p13　ヤセウツボの種子発芽に特徴的なプランテオース代謝に関わる酵素の探索**
**17:20**　°馬場敦也[1]，徳永智哉[1]，木場康介[1]，小川拓水[1]，杉本幸裕[2,3]，太田大策[1]，岡澤敦司[1,3]（[1]阪府大生環，[2]神大農，[3]JST/JICA SATREPS）

**2J31p14　タバコはいかにニコチンを合成するようになったのか？：二次代謝生合成系の分子進化**
**17:35**　°庄司　翼[1]，梶川昌孝[2]，川口治彦[1]，橋本　隆[1]（[1]奈良先端大，[2]京大生命）

**2J31p15　イネのフラボノイド化合物サクラネチンの生産誘導におけるジャスモン酸と フォスファチジン酸の協調作用**
**17:50**　°石田明大[1,4]，小川哲史[1]，西澤洋子[2]，南　栄一[2]，山根久和[3]，有村源一郎[4]，野尻秀昭[1]，岡田憲典[1]（[1]東大・生物工学セ，[2]農研機構，[3]帝京大・バイオ，[4]理科大基礎工）

**2J31p16　エダマメに含まれるフラボノイド類の網羅解析**
**18:05**　°中村　李[1]，清水康貴[1]，佐々木亮介[2]，斉藤和季[2,3]，及川　彰[1,2]（[1]山形大農，[2]理研 CSRS，[3]千葉大院薬）

## J32 会場　午前の部（9:20〜12:00）

植物―植物ホルモン，成長調節物質―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**2J32a01　根寄生雑草被害の低減を目指した ShKAI2s の機能解析**
**9:20**　°今村優作[1]，高橋郁夫[1]，呂　瑩[1]，胡　文倩[1]，福井康佑[1,2]，徐　玉群[1]，宮川拓也[1]，中村英光[1]，田之倉優[1]，浅見忠男[1]（[1]東大院・農生科・応生化，[2]岡山理科大・理）

**2J32a02　新規ストリゴラクトンミミックの生理活性の評価と生化学的解析**
**9:35**　°中村英光，呂　瑩，山野博之，喜久里貢，姜　凱，徐　玉群，宮川拓也，田之倉優，浅見忠男（東大院・応生科・農生科）

**2J32a03　ストリゴラクトン生合成における MAX1 ホモログの機能解析**
**9:50**　°佐藤智康[1]，米山香織[2]，森　愛美[3]，齋藤睦美[4]，謝　肖男[1,2]，秋山康紀[3]，米山弘一[1,2]，野村崇人[1,2]（[1]宇都宮大院・農，[2]宇都宮大・バイオ，[3]大阪府立大院・生命環境，[4]宇都宮大・農）

**2J32a04　ストリゴラクトン生合成における LBO ホモログの機能解析**
**10:05**　°依田彬義[1]，米山香織[2]，森　愛実[3]，Philip Brewer[4]，謝　肖男[2]，Christine Beveridge[4]，秋山康紀[3]，米山弘一[2]，野村崇人[2]（[1]宇都宮大・農，[2]宇都宮大・バイオ，[3]大阪府立大院・生命環境，[4]クイーンズランド大）

**2J32a05　ミヤコグサのストリゴラクトン生合成における新規 MAX1 産物の同定**
**10:20**　°森　愛美[1]，米山香織[2]，謝　肖男[2]，野村崇人[2]，米山弘一[2]，秋山康紀[1]（[1]阪府大院・生命環境，[2]宇都宮大学バイオサイエンス教育研究センター）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**2J32a06　ソラナコール型カーラクトン類のトマト MAX1 および LBO による変換**
**10:45**　°野上香奈[1]，米山香織[2]，野村崇人[2]，米山弘一[2]，秋山康紀[3]（[1]阪府大・生命環境，[2]宇都宮大学バイオサイエンス教育研究センター，[3]阪府大院・生命環境）

**2J32a07　ストリゴラクトン受容体阻害剤の探索**
**11:00**　°久保田真康[1]，間下大樹志[1]，伊藤晋作[1,2]，中村英光[1]，浅見忠男[1]（[1]東大院・農生科・応生化，[2]東農大・応生科・バイオ）

**2J32a08　STH7 Is Related to The Induction of Light-adapted Development by Strigolactone in *Arabidopsis thaliana***
**11:15**　°Jutiporn Thussagunpanit[1]，Yuko Nagai[1]，Takeshi Nakano[2]，Hidemitsu Nakamura[1]，Tadao Asami[1]（[1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo，[2]CSRS, RIKEN）

**2J32a09　D14 と相互作用する転写因子・NF-YC の機能解析**
**11:30**　°池上佳菜子，高橋郁夫，中村英光，浅見忠男（東大院・農生科・応生化）

**2J32a10　根寄生植物 *Striga hermonthica* 防除を目的とした合成エチレンミミックの構造活性相関と *ShETR1* の解析**
**11:45**　◦水野　翼[1]，北畑信隆[2]，鈴木優志[1]，浅見忠男[1]（[1]東大院・農生科，[2]東理大・理）

## J32 会場　午後の部（14:00〜18:20）

植物―植物ホルモン，成長調節物質―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**2J32p01　苔類ゼニゴケにおける MpTIR1 を介したオーキシン受容機構と生理機能の解析**
**14:00**　◦鈴木秀政，加藤大貴，山岡尚平，西浜竜一，河内孝之（京大 生命）

**2J32p02　苔類ゼニゴケの AMP1 および CYP78 ホモログは関連した発生調節機能を持つ**
**14:15**　◦池田敬登[1]，桐田啓如[1]，桧原健一郎[2]，山岡尚平[1]，西浜竜一[1]，河内孝之[1]（[1]京大生命，[2]東大農学生命）

**2J32p03　ヒメツリガネゴケ原糸体の分化制御に関わる新奇生理活性物質の同定**
**14:30**　◦宮崎　翔[1]，原万里穂[1]，伊藤晋作[2]，田中啓介[3]，川出　洋[4]，林謙一郎[5]，浅見忠男[1]，中嶋正敏[1]（[1]東大院・農生科，[2]東農大・応生化，[3]東農大・ゲノムセンター，[4]東京農工大院・農，[5]岡山理大・理）

**2J32p04　Comparative effects of ethylene inhibitors in Agrobacterium-mediated transformation of wild watermelon**
**14:45**　◦GOITSEONE MALAMBANE[1]，SATOKO NONAKA[2]，SHIBA HIROSHI[2]，HISASHI TSUJIMOTO[3]，KINYA AKASHI[1,3]（[1]The United Graduate School of Agriculture, Tottori University, [2]Graduate school of Life and Environmental sciences, University of Tsukuba, [3]Arid Land Research Center, Tottori University）

**2J32p05　新規エチレン様活性物質の耐性変異体の選抜**
**15:00**　◦北畑信隆[1,2]，渡辺健志郎[1]，鈴木優志[3]，浅見忠男[3]，朽津和幸[1,2]（[1]東京理科大・応用生物科，[2]東京理科大・イメージングフロンティア，[3]東大院・農生科）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**2J32p06　ブラシノライド様化合物のための分子設計**
**15:25**　◦杉浦愛理[1]，幌岩真理[1]，青木孝憲[1]，山上あゆみ[2]，中野雄司[2]，中川好秋[1]，宮川　恒[1]（[1]京大院農，[2]理研 CSRS）

**2J32p07　オオムギ矮性遺伝子 *brachytic1* の解明**
**15:40**　◦伊藤歩惟，安田歩未，山岡康輔，堅田雄也，上田美奈瀬，中山　明，本多一郎（前橋工大・生物工学）

**2J32p08　内生植物ホルモン量分析に基づく植物ホルモン受容体制御剤の機能解析研究**
**15:55**　◦都外川識志[1]，宮崎　翔[1]，尹　禎敏[1]，竹内　純[2]，轟　泰司[3]，林謙一郎[4]，中嶋正敏[1]，浅見忠男[1]（[1]東大院・農生科・応生化，[2]静大・学術院融合グローバル領域，[3]静大・農，[4]岡山理科大・理学部・生物化学科）

**2J32p09　ジベレリン生合成および代謝酵素の構造解析と機能解析**
**16:10**　◦竹原清日[1]，三上文三[2]，河合恭甫[1]，松岡　信[1]，上口(田中)美弥子[1]（[1]名大・生物機能セ，[2]京大院・農）

**2J32p10　イネの葯特異的に発現をするジベレリン 3 酸化酵素 1 の機能解析**
**16:25**　◦河合恭甫，竹原清日，松岡　信，上口(田中)美弥子（名大・生物機能セ）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**2J32p11　*Oryza* 属におけるジベレリン生合成 *ent*-カウレン合成酵素遺伝子**
**16:50**　◦豊増知伸[1]，伊藤　瑛[1]，宮本皓司[2]，Matthew Shenton[3]，今井亮三[4]，三橋　渉[1]，倉田のり[3]，山根久和[2]，岡田憲典[5]（[1]山形大農，[2]帝京大バイオ，[3]遺伝研，[4]農研機構，[5]東大生工セ）

**2J32p12　ジベレリン活性制御剤の探索および機能解析**
**17:05**　◦下尾純平，宮崎　翔，大谷征史，都外川識志，中村英光，中嶋正敏，浅見忠男（東大院・農生科・応生化）

**2J32p13　光学活性ジャスモン酸のイネにおける生理活性**
**17:20**　◦宮本皓司[1]，内田健一[1]，湯本絵美[1]，酒澤智子[1]，柴田恭美[1]，横田孝雄[1]，飯野盛利[2]，山根久和[1]（[1]帝京大バイオ，[2]大阪市大院・理）

**2J32p14　イヌカタヒバにおけるジャスモン酸類の同定および機能解析**
**17:35**　◦高橋公咲[1]，プラティウィブトリ[1]，高橋知寛[1]，謝　肖男[2]，米山弘一[2]，松浦英幸[1]（[1]北大院農，[2]宇都宮大バイオ）

**2J32p15　Cytokinin dehydrogenase を反応機構的に阻害する蛍光標識分子の合成**
**17:50**　◦黒沼亜希子，飯野誠之，杉山民二（明治大院農）

**2J32p16　植物病害抵抗性制御剤の開発と構造活性相関研究**
**18:05**　◦青木智史，姜　凱，高橋郁夫，栗本哲哉，中村英光，浅見忠男（東大院・農生科・応生化）

## J33 会場　午前の部（9:20〜12:00）

酵素―糖質代謝関連酵素―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**2J33a01　アルキルグリコシドを糖受容体とする α-アミラーゼによる酵素的配糖化反応の最適化**
**9:20**　◦伊藤　博，小林厚志（日大工）

**2J33a02　新規特性を有するシアノバクテリア由来枝切り酵素の構造機能解析**
**9:35**　◦鈴木龍一郎[1]，木村友亮[1]，佐々木桂秀[1]，COLLEONI Christophe[2]，BALL Steven[2]，藤田直子[1]，鈴木英治[1]（[1]秋田県大生物資源，[2]リール科技大）

**2J33a03　マツタケ（*Tricholoma matsutake*）由来菌体外グルコアミラーゼの精製と性質**
**9:50**　◦原　健人，大沼広宜，亀井健吾，福田泰久，白坂憲章（近大農）

**2J33a04　マツタケ（*Tricholoma matsutake*）由来菌体外グルコアミラーゼの *Pichia pastoris* による分泌発現**
**10:05**　◦大沼広宜，原　健人，内山寛人，亀井健吾，福田泰久，白坂憲章（近大農）

**2J33a05　非凍結結晶を用いた β-アミラーゼ／基質複合体の pH による構造変化の解析**
**10:20**　◦三上文三[1]，河村和広[1]，安達基泰[2]，姜　有那[1]，水谷公彦[1]，高橋延行[1]（[1]京大農，[2]日本原子力機構）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**2J33a06　Characterization of thermostable α-glucosidase from *Geobacillus caldoxylosilyticus* NBRC 107762, which displays remarkable transglucosylation**
**10:45**　◦Min MA，Masayuki OKUYAMA，Takayoshi TAGAMI，Atsuo KIMURA（Hokkaido Univ.）

**2J33a07　*Bacteroides thetaiotaomicron* 由来マンノシル-β-1,4-*N*-アセチルグルコサミンホスホリラーゼの X 線結晶構造解析**
**11:00**　◦間島滉一郎[1]，仁平高則[2]，中井博之[2]，北岡本光[3]，荒川孝俊[1]，伏信進矢[1]（[1]東大・院農，[2]新潟大農，[3]農研機構　食品研）

**2J33a08　GH130_2 マンノシドホスホリラーゼの基質特異性に関与するアミノ酸残基**
**11:15**　◦播磨晃帆[1]，佐分利亘[2]，森　春英[2]（[1]北大農，[2]北大院農）

**2J33a09　*Treponema caldarium* 由来 β-1,3-oligoglucan phosphorylase 遺伝子の発現**
**11:30**　◦中越麻里菜，谷　修治，炭谷順一，川口剛司（阪府大院生環）

**2J33a10　*Thermotoga maritima* 由来耐熱性マンノオリゴ糖ホスホリラーゼの機能解析**
**11:45**　◦中澤篤志[1]，佐分利亘[2]，吉田靖彦[3]，津村和伸[4]，伊吹昌久[3]，森　春英[2]（[1]北大農，[2]北大院農，[3]不二製油株式会社，[4]不二製油グループ本社）

## J33 会場　午後の部（14:00〜18:20）

酵素―糖質代謝関連酵素―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**2J33p01　ポリケタイド化合物の分子多様性を生み出す生合成酵素の構造機能研究（奨励賞受賞講演）**
**14:00**　○宮永顕正　（東京工業大学理学院）

**2J33p02　ヒト腸内細菌が有する母乳オリゴ糖分解酵素 LnbX ホモログの機能解析**
**14:15**　○山田千早[1]，　伏信進矢[2]，　後藤愛那[1]，　加藤紀彦[1]，片山高嶺[1]（[1]京大院・生命研，[2]東大院・農生科）

**2J33p03　ムチン糖鎖に作用するビフィズス菌由来スルフォグリコシダーゼの同定と機能解析**
**14:30**　○加藤紀彦[1]，　前渋貴子[1]，　吉川慶一[2]，　後藤愛那[1]，苫米地祐輔[2]，芦田　久[3]，山本憲二[2]，片山高嶺[1,2]（[1]京大院生命，[2]石川県大・生資環，[3]近畿大・生物理工）

**2J33p04　GH129 *α-N*-アセチルガラクトサミニダーゼの金属結合サイトと阻害剤を用いた解析**
**14:45**　○佐藤真与[1]，　LIEBSCHNER Dorothee[2]，　山田悠介[2]，松垣直宏[2]，　千田俊哉[2]，　荒川孝俊[1]，　芦田　久[3]，　伏信進矢[1]（[1]東大農，[2]高エネ研，[3]近大）

**2J33p05　ヒト腸内細菌 *Prevotella copri* 由来の変異型キシラナーゼ 10B（Xyn10B）の特性解析**
**15:00**　○小黒弘貴[1]，　小林海渡[1]，　吉村弥生[3]，　林　史夫[4]，松尾一郎[3]，林　秀謙[1,2]（[1]前工大院工，[2]前工大工，[3]群大院理工，[4]群大・機器分析）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**2J33p06　*B. longum* JCM1217 由来 GH127 β-L-アラビノフラノシダーゼ（HypBA1）の機能構造解析**
**15:25**　○丸山　瞬[1]，　伊藤　佑[1]，　藤田清貴[2]，　石渡明弘[3]，伊藤幸成[3]，荒川孝俊[1]，伏信進矢[1]（[1]東大院農生科，[2]鹿児島大生物資源化学科，[3]理研）

**2J33p07　*Bifidobacterium longum* subsp. *longum* の II 型アラビノガラクタン分解酵素群の解析**
**15:40**　○藤田清貴，坂本彩美，嵩下愛果，東郷奈未，北原兼文（鹿児島大・農）

**2J33p08　エリシター遊離活性をもつ二種類のダイズ由来グルカナーゼの機能**
**15:55**　○高島智也，大沼貴之，深溝　慶（近大院農）

**2J33p09　エンド-1, 3- β-グルカナーゼ触媒ドメインの機能構造解析**
**16:10**　○三木彩子[1]，　稲葉理美[1]，　櫻井一正[2]，　池上貴久[3]，伊島理枝子[4]，織田昌幸[1]（[1]京府大・院生命環境科学，[2]近畿大・高圧蛋白研，[3]横浜市大・生命医科，[4]ピッツバーグ大学・構造生物学）

**2J33p10　*Vibrio* 由来 glycoside hydrolase family 17 の機能未知な C 末端領域は酵素活性の発現に必須である**
**16:25**　○熊谷祐也，田上貴祥，奥山正幸，木村淳夫（北大院農）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**2J33p11　*Talaromyces funiculosus* 由来 β-1,2-グルカナーゼの複合体構造**
**16:50**　○田中信清[1]，　阿部紘一[1]，　中島将博[1]，　中井博之[2]，宮永顕正[3]，田口速男[1]（[1]東理大院，[2]新潟大，[3]東工大）

**2J33p12　担子菌 *Coprinopsis cinerea* 由来 α-L-アラビノフラノシダーゼ CcAbf62A の触媒ドメインの X 線結晶構造解析**
**17:05**　○殿塚隆史[1]，　田中祐太郎[1]，　奥山舜朔[1]，　宮崎剛亜[1]，西河　淳[1]，吉田　誠[2]（[1]東京農工大院応生化，[2]東京農工大院環境資源）

**2J33p13　*Falsirhodobacter* sp. alg1 由来のアルギン酸リアーゼによる 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid の調製**
**17:20**　○村瀬祥光[1]，　柴田敏行[1]，　モリテツシ[2]，　田中礼二[1]，植田充美[3]，三宅英雄[1,4]（[1]三重大院生資，[2]早大理工学術院，[3]京大院農，[4]三重大生命支セ）

**2J33p14　糖供与体選択性の異なる β-グルコシダーゼが触媒する L-アスコルビン酸への糖転移反応の速度論的研究**
**17:35**　○菅沼笙子，寺坂美紀，仁戸田照彦，神崎　浩（岡山大院環境生命）

**2J33p15　*Ruminiclostridium josui* 由来のフェルラ酸エステラーゼ Fae1A の酵素特性と CBM の吸着特性の解析**
**17:50**　○間宮　愛，勝崎裕隆，粟冠真紀子，木村哲哉，粟冠和郎（三重大院生物資源）

**2J33p16　*Luteolibacter algae* H18 由来フコイダンデアセチラーゼの特性評価**
**18:05**　○長尾達彦[1,2]，　小松史佳[1]，　八木寿梓[3]，　鈴木宏和[1]，大城　隆[1]（[1]鳥取大院・工，[2]深江化成株式会社，[3]鳥取大・工・GSC）

## J34 会場　午前の部（9:20〜12:00）

酵素―酸化還元酵素―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**2J34a01　ヒドラジン合成反応を触媒するマルチヘムタンパク質複合体の結晶構造**
**9:20**　○北村龍史[1]，　平　大輔[1]，　中村照也[2]，　山縣ゆり子[2]，古川憲治[3]，藤井隆夫[1]（[1]崇城大・応生命，[2]熊大・薬，[3]熊大院・自然科学）

**2J34a02　anammox 菌のヒドロキシルアミン酸化還元酵素とモノヘムシトクロム *c* の電子伝達反応**
**9:35**　○平　大輔[1]，　中村照也[2]，　山縣ゆり子[2]，　古川憲治[3]，藤井隆夫[1]（[1]崇城大応生命，[2]熊大院薬，[3]熊大院自然科学）

**2J34a03　*Ogataea polymorpha* NBRC 0799 株が産生する 2 つのカルボニル還元酵素の性質解明と大腸菌で発現させた組換え酵素を用いたトリフルオロアセトンの還元反応**
**9:50**　○三木慎介[3]，　七田沙耶香[1,2]，　奥　祐子[1,2]，　松井大亮[1,2]，礒部公安[1,2]，西井哲郎[3]，淺野泰久[1,2]（[1]富山県大生工科・生工研セ，[2]JST, ERATO，[3]セントラル硝子㈱）

**2J34a04　Application of aldoxime dehydratases（Oxd）in organic nitrile syntheses**
**10:05**　○Richard Metzner[1,2]，　Yufeng Miao[1,2]，　Akari Yagi[1]，Alessa Hinzmann[3]，Yasuhisa Asano[1,2]（[1]Biotechnology Research Center and Department of Biotechnology, Toyama Prefectural University, [2]Asano Active Enzyme Molecule Project, ERATO, JST, [3]Faculty of Chemistry, Organic Chemistry I, Bielefeld University）

**2J34a05　不斉酸化反応を触媒する固定化蛍光菌 HasApf（SanCat-Super）**
**10:20**　○永岡宏行（サンヨー食品開発）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**2J34a06　キノン補酵素生合成に関わる FAD 依存性モノオキシゲナーゼ QhpG の分光学的特性と基質タンパク質 QhpC との相互作用**
**10:45**　○大関俊範，中井忠志，谷澤克行，岡島俊英（大阪大学 産業科学研究所）

**2J34a07　ペルオキシレドキシン Q との相互作用を調節するシロイヌナズナ・チオレドキシンの重要なアミノ酸残基**
**11:00**　○手島圭三，宇都宮健，相川瑞季，中川直樹（広大院・生物圏）

**2J34a08　*Shewanella* 属細菌由来シトクロム *c* ' の安定性の比較研究**
**11:15**　○須賀朝子[1]，　加藤雄基[2]，　藤井創太郎[2]，　三本木至宏[2]（[1]広島大生物生産，[2]広島大院生物圏）

**2J34a09　*Aspergillus aculeatus* 由来 FAD 型グルコースデヒドロゲナーゼ AaGDHb の機能解析**
**11:30**　○岡　修司，谷　修治，炭谷順一，川口剛司（阪府大院生還）

**2J34a10　Thermophilic bacteria are potential sources of novel Rieske non-heme iron oxygenases**
**11:45**　○Joydeep CHAKRABORTY，Chiho SUZUKI-MINAKUCHI，Kazunori OKADA，Hideaki NOJIRI（The Univ. of Tokyo）

## J34 会場　午後の部（14:00〜18:20）

酵素―酸化還元酵素，その他―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**2J34p01　*Geobacter sulfurreducens* が有するマルチヘム含有セレンタンパク質の精製と機能解析**
**14:00** ○戸部隆太，神農美希，嶌本奈々，三原久明（立命大生命）

**2J34p02　*In vitro* and *in vivo* analyses of a putative outer membrane channel protein, GSU2939, of the metal-reducing bacterium *Geobacter sulfurreducens***
**14:15** ○Mst. Ishrat JAHAN[1]，Ryota TOBE[1]，Jun KAWAMOTO[2]，Tatsuo KURIHARA[2]，Hisaaki MIHARA[1]（[1]Ritsumeikan Univ.，[2]Kyoto Univ.）

**2J34p03　大腸菌を宿主とする *Myrothecium verrucaria* 由来ビリルビンオキシダーゼの高活性発現系**
**14:30** ○野路晴菜，新保宏樹，櫻井　武，片岡邦重（金沢大院自然科学）

**2J34p04　ビリルビンオキシダーゼのタイプ I 銅部位に存在する Trp396-His398 間共有結合の役割**
**14:45** ○片岡邦重，奥田葉子，野路晴菜，櫻井　武（金沢大院自然科学）

**2J34p05　超好熱アーキア *Pyrobaculum aerophilum* 由来変異型マルチ銅オキシダーゼの機能解析**
**15:00** ○稲垣康平[1]，里村武範[1,2]，櫻庭春彦[3]，大島敏久[4]，末信一朗[1,2]（[1]福井大院工，[2]福井大ライフ，[3]香川大農，[4]大阪工大工）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**2J34p06　コファクター欠損変異体からみるフルクトース脱水素酵素の直接電子移動**
**15:25** ○日比野佑哉，河井翔太，北隅優希，白井　理，加納健司（京大院農）

**2J34p07　糖鎖除去したラッカーゼの発現系の構築と性質**
**15:40** ○山根祥平[1]，野﨑功一[1]，干川康人[2]，今井雄大[2]，多和田華子[2]，京谷　隆[2]，伊藤徹二[3]（[1]信州大院・理工，[2]東北大・多元物質科学研，[3]産総研）

**2J34p08　ラッカーゼのキメラ酵素の異種発現と酵素化学的諸性質**
**15:55** ○門島洸司郎[1]，野﨑功一[1]，山根祥平[1]，干川康人[2]，今井雄大[2]，京谷　隆[2]，伊藤徹二[3]（[1]信州大院・理工，[2]東北大・多元物質科学研，[3]産総研）

**2J34p09　ピペロナール代謝酵素の酵素学的解析**
**16:10** ○土居志織[1]，橋本義輝[2]，富田千晶[2]，熊野匠人[2]，小林達彦[2]（[1]慶應義塾大学，[2]筑波大院・生命環境）

**2J34p10　麹菌 D-乳酸脱水素酵素の細菌酵素型アロステリック活性促進特性と活性阻害について**
**16:25** ○渡部　昭，佐藤陽子，五味勝也（東北大院・農・生物産業創成）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**2J34p11　D-アミノ酸資化能を有する好熱性真菌の単離と D-アミノ酸オキシダーゼ遺伝子の探索**
**16:50** ○七五三掛湧也，高橋祥司，阿部勝正，解良芳夫（長岡技科大・生物）

**2J34p12　ニトリル合成酵素の酸化還元反応触媒能**
**17:05** ○橋本義輝，山田優駿，熊野匠人，小林達彦（筑波大院 生命環境）

**2J34p13　*Eggerthella* sp. YY7918 株由来の旧黄色酵素 ダイゼインレダクターゼの機能解析**
**17:20** ○川田結花[1]，五島智子[2]，澤村理恵[2]，横山慎一郎[2,3]，丹羽利夫[4]，柳瀬笑子[2]，稲垣瑞穂[2]，海老原章郎[2]，山口圭一[5]，加藤雄太[6]，桑田一夫[5]，櫻田　修[6]，鈴木　徹[2]（[1]岐阜大・連合農学研究科，[2]岐阜大･応用生物科学部，[3]岐阜県産業技術センター，[4]修文大・健康栄養学部，[5]岐阜大・連合創薬医療情報研究科，[6]岐阜大・工学部）

**2J34p14　補因子結合に伴う 3 α-hydroxysteroid dehydrogenase の構造変化の解析**
**17:35** ○稲葉理美[1]，吉田卓也[2]，織田昌幸[1]（[1]京府大院生命環境科学，[2]阪大院薬）

**2J34p15　オオムギにおけるアグマチンクマロイルトランスフェラーゼの解析**
**17:50** ○山根美代[1]，矢嶋俊介[2]，須恵雅之[3]（[1]東農大・農化，[2]東農大・バイオ，[3]東農大・生応化）

**2J34p16　鉄硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 由来テトラチオン酸ハイドロラーゼの結晶構造解析**
**18:05** ○長谷成記[1]，小坂　恵[2]，玉田太郎[3]，上村一雄[1]，金尾忠芳[1]（[1]岡山大院・環境生命，[2]岡山大・自科支セ，[3]量子研・QST）

講演番号
開始時間　　演　　題　　発表者氏名（所属）

## A01 会場　午前の部（9:20〜12:00）

動物―個体－生理・栄養・代謝，生体機能，生体制御―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**3A01a01　フルクトース誘導性脂肪肝によるセリン代謝変動**
**9:20**　◦清水　誠，井上聖哉，井上　順，佐藤隆一郎（東大院農生科・応生化）

**3A01a02　ATF4-FGF21 経路を活性化する新規食品成分の探索・解析**
**9:35**　◦藤木航平，丸山竜人，清水　誠，井上　順，佐藤隆一郎（東大院 農生科・応生化）

**3A01a03　酸化コレステロールは INSIG-2 を介して ATF4 の発現を制御する**
**9:50**　◦三吉翔子，渡邉雄一，清水　誠，井上　順，佐藤隆一郎（東大院農生科・応生化）

**3A01a04　脂肪酸合成制御因子 MIG12 の遺伝子欠損マウスの解析**
**10:05**　◦成田淳子，清水　誠，井上　順，佐藤隆一郎（東大院 農生科・応生化）

**3A01a05　胆汁酸受容体 TGR5 が骨格筋機能に及ぼす影響および発現調節機構の解析**
**10:20**　◦佐々木崇[1]，　三田萌子[1]，　村田翔太朗[1]，　久保山文音[2]，清水　誠[1]，井上　順[1]，佐藤隆一郎[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]東大農）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**3A01a06　マスリン酸による筋肥大効果の解析**
**10:45**　◦村田翔太朗，　佐々木崇，　清水　誠，　井上　順，佐藤隆一郎（東大院農生科・応生化）

**3A01a07　肝臓における胆汁酸受容体 TGR5 の発現制御機構解析**
**11:00**　◦松木美紗，佐々木崇，清水　誠，井上　順，佐藤隆一郎（東大院農生科・応生化）

**3A01a08　Tmem100 の発現制御機構解析**
**11:15**　◦久保山文音[1]，　佐々木崇[2]，　清水　誠[2]，　井上　順[2]，佐藤隆一郎[2]（[1]東大農，[2]東大院農生科・応生化）

**3A01a09　病態マーカーとしての脂肪酸アミド化合物の解析**
**11:30**　◦岡本拓也[1]，柴田貴広[1]，吉武　淳[2]，内田浩二[1,3]　（[1]名大院・生命農，[2]名大・未来社会，[3]東大院・農生科）

**3A01a10　アデノシンの構成物質と代謝産物が血糖値に与える影響**
**11:45**　◦鳥羽裕太郎，　沼田綺葉，　田尻彩音，　清水　誠，服部一夫，只石　幹（東農大・応生科・栄養）

## A01 会場　午後の部（14:00〜18:20）

動物―個体－生理・栄養・代謝，生体機能，生体制御，タンパク質－構造，機能，活性，修飾，分解，局在，プロテオーム―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**3A01p01　タンパク質欠乏による血中ビタミン E 濃度低下機構**
**14:00**　◦佐藤遼太[1]，　日野美佳[1]，　長田恭一[2]，　川端博秋[2]，林　洪太[1]，竹中麻子[2]（[1]明大院農，[2]明大農）

**3A01p02　卵巣摘出ラットの肝臓におけるオートファジーの変動**
**14:15**　◦金沢　匠（千葉県立保健医療大栄養）

**3A01p03　線虫を用いた繰り返し絶食が生体に及ぼす影響の検討**
**14:30**　◦松本晋也，山本玲奈，山本佳苗，長尾美咲，佐藤奈央，山本さゆり，澤永朱里（京女大食物栄養）

**3A01p04　プロスタグランジン $D_2$ に由来する脂質メディエーターの解析**
**14:45**　◦犬塚恵美[1]，柴田貴広[1]，内田浩二[1,2]　（[1]名大院・生命農，[2]東大院・農生科）

**3A01p05　食品由来 TRPM8 アゴニスト胃内投与による体温変化の作用機序の検討**
**15:00**　◦森　紀之，浦田朋実，福渡　努（滋賀県大人間文化）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**3A01p06　分子内 FRET を用いたヒト多剤排出ポンプ(MDR1, ABCB1)の構造変化解析手法の確立**
**15:25**　◦二股良太[1]，　小笠原史彦[1]，　市川尚文[1]，　木村泰久[1]，木岡紀幸[1]，植田和光[1,2]（[1]京大院農，[2]京大・iCeMS）

**3A01p07　ABCA1 と apoA-I によるコレステロール排出メカニズム解明への新しい定量的アプローチ**
**15:40**　◦三好里奈[1]，　小笠原史彦[1]，　石神正人[1]，　永田　紅[1,2]，木村泰久[1]，木岡紀幸[1]，植田和光[1,2]（[1]京大院農・応用生命科学，[2]京大 iCeMS）

**3A01p08　ヒト ABCB6 によるポルフィリン認識機構の解析**
**15:55**　◦西澤奈美[1]，木村泰久[1]，大貫　元[1]，木岡紀之[1]，植田和光[1,2]（[1]京大院・農・応用生命，[2]京大・iCeMS）

**3A01p09　網羅的探索により見出した N-ミリストイル化された多重回膜貫通タンパク質の解析**
**16:10**　◦黄波戸亜哉，松﨑嘉奈子，守屋康子，内海俊彦（山口大創成科学）

**3A01p10　新規リジン長鎖アシル化タンパク質 TEAD の機能解析**
**16:25**　◦則次恒太[1,2]，　伊藤昭博[1,3]，　工藤紀雄[4]，　鈴木健裕[5]，堂前　直[5]，吉田　稔[1,2,3,4]（[1]理研・化学遺伝，[2]東大院・農生科・応生工，[3]理研・環境資源・ケミカルゲノミクス，[4]理研・環境資源・創薬シード，[5]理研・環境資源・生命分子解析）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**3A01p11　哺乳類の嗅覚系における膜貫通受容体 CD36 の発現**
**16:50**　◦李　信恵[1]，　江口　愛[1]，　都築　巧[1]，　松村成暢[1]，井上和生[1]，岩永敏彦[2]，増田大作[3]，山下静也[3]，伏木　亨[4]（[1]京大院農，[2]北大院医，[3]阪大院医，[4]龍大農）

**3A01p12　GATA2 によるマスト細胞プロテアーゼの発現制御機構**
**17:05**　◦笠倉和巳，中谷　光，新井貴大，八代拓也，西山千春（東理大・基礎工）

**3A01p13　脂質異常症に関連した修飾血清アルブミン構造の解析**
**17:20**　◦中島史恵[1]，柴田貴広[1,2]，菊地良介[3]，松下　正[3]，内田浩二[1,4]（[1]名大院・生命農，[2]JST　さきがけ，[3]名大・医・附属病院，[4]東大院・農生科）

**3A01p14　ジアジド標識ホモシスチンを用いた S-ホモシステイン化タンパク質の解析**
**17:35**　◦神谷孝平[1]，柴田貴広[1]，中島史恵[1]，内田浩二[1,2]　（[1]名大院・生命農，[2]東大院・農生化）

**3A01p15　アダクトーム解析法を用いた高脂血症バイオマーカー候補の探索**
**17:50**　◦柴田貴広[1,2]，　清水和真[1]，　平野啓太[1]，　菊地良介[3]，松下　正[3]，内田浩二[1,4]　（[1]名大院・生命農，[2]JST さきがけ，[3]名大・医・附属病院，[4]東大院・農生科）

**3A01p16　骨分化誘導タンパク質 NELL1 の Robo ファミリー受容体への結合能の解析**
**18:05**　◦山本菜央佳[1]，新美友章[2]（[1]名大・農，[2]名大院・生命農）

## A02 会場　午前の部（9:20〜12:00）

動物―細胞－情報伝達，細胞応答，分化制御，メタボローム―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**3A02a01　前駆脂肪細胞分化前におこる DNA 複製の意義**
**9:20**　◦奥村克純[1]，　大河内七海[1]，　竹林慎一郎[2]，　緒方正人[2]，緒方　進[1]（[1]三重大院生資，[2]三重大院医）

**3A02a02　白色脂肪組織の部位特異的な形質の解析―皮下脂肪組織，内臓脂肪組織，異所性脂肪組織の性質の差異の解明―**

**9:35** ○鎌田奈都美[1]，　金井すみれ[2]，　眞田洋平[2]，　加藤範久[2]，島田昌之[2]，矢中規之[2]（[1]広島大・生物生産，[2]広島大院・生物圏）

**3A02a03　肥満白色脂肪組織で高発現する amphiregulin の単離と脂肪組織特異的過剰発現マウスの作製**

**9:50** ○有馬岳志[1]，　楊　　波[2]，　久本高央[2]，　中村美奈子[2]，眞田洋平[2]，加藤範久[2]，外丸祐介[3]，島田昌之[2]，矢中規之[2]（[1]広島大生物生産，[2]広島大院生物圏科学，[3]広島大自然科学センター）

**3A02a04　抑制性転写因子 BCL11B による脂肪細胞分化および脂肪蓄積制御の解析**

**10:05** ○井上　順[1]，　井原悠介[1]，　塚本大介[1]，　安本啓甫[1]，橋詰　力[1]，中井雄治[2]，清水　誠[1]，佐藤隆一郎[1]　（[1]東大院農生科・応生化，[2]弘前大・食料研）

**3A02a05　間葉系幹細胞分化のレチノイン酸制御に与える接着斑タンパク質ビネキシンの影響**

**10:20** ○高田恭子[1]，　黒田美都[1,3]，　木村泰久[1]，　植田和光[1,2]，木岡紀幸[1,2]（[1]京大農，[2]iCeMS，[3]日本学術振興会特別研究員 DC）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**3A02a06　ビンキュリンはアクチン細胞骨格を介して間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化を抑制する**

**10:45** ○黒田美都[1,3]，植田和光[1,2]，木岡紀幸[1]（[1]京大農，[2]京都大学 iCeMS，[3]日本学術振興会特別研究員 DC）

**3A02a07　細胞分化における核内アクチンの機能解析**

**11:00** ○横山吟司[1]，　山本浩志[2]，　山崎祥他[2]，　十川久美子[3]，徳永万喜洋[3]，原田昌彦[1,2]　（[1]東北大農，[2]東北大院農，[3]東工大院生命理工）

**3A02a08　乳腺退縮に関わる転写因子の発現および機能解析**

**11:15** ○藤田夢実，柴山太寿，蒲野悟史，大島健司，松田　幹，灘野大太（名大農）

**3A02a09　DNA 傷害によるアポトーシス誘導における DRAK1 の関連性**

**11:30** ○村上彩良[1]，大上友菜[2]，辻　明彦[3]，湯浅恵造[3]（[1]徳島大院先端技術，[2]徳島大工生物工，[3]徳島大院生物資源）

**3A02a10　結合モチーフに基づいたカルシウム結合タンパク質 ALG-2 の新規相互作用因子探索と同定**

**11:45** ○牧　正敏，松尾里奈，張　　維，寺西直樹，高原照直，柴田秀樹（名大院生命農・応分生）

## A02 会場　午後の部（14:00〜18:20）

動物―細胞－情報伝達，細胞応答，分化制御，メタボローム，細胞工学－物質生産，タンパク質工学，細胞培養，細胞外マトリックス―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**3A02p01　ヒト細胞株において cyclin A-CDK の活性亢進が M 期進行へ及ぼす影響**

**14:00** ○赤池康範，吉川博文，千葉櫻拓（東農大院バイオ）

**3A02p02　新規膵臓がん幹細胞制御分子の同定**

**14:15** ○竹内智枝理，高井美佳，廣井　舜，熊添基文，立花宏文（九大院農院・生機科）

**3A02p03　抗菌ペプチドによって誘導される大腸癌細胞由来エクソソームの解析**

**14:30** ○林　美和，黒田健吾，伊原航平，磯貝恵美子（東北大農）

**3A02p04　Pin1 による FoxO3 を介した P-glycoprotein の発現制御機構**

**14:45** ○清水泰希，坂場義正，川邊庸介，内田隆史（東北大農）

**3A02p05　分解耐性型細胞膜透過性レチノイン酸受容体(RAR)α 発現系の開発**

**15:00** ○佐々木拓哉，舛廣善和，司馬　肇（日本大学 生物資源応用生物）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**3A02p06　ES 細胞の神経分化における転写因子 CIBZ の機能解析**

**15:25** ○西尾美紀，松田永照（奈良先端大バイオ）

**3A02p07　*C. elegans* の ASJ ニューロンに発現する SRH-11 のリガンド応答**

**15:40** ○高須　浩[1]，　金川陽祐[1]，　西村浩二[1]，　河野　強[2]，尾添嘉久[1]（[1]島根大生資，[2]鳥取大農）

**3A02p08　初代培養グリア細胞における 2ccPA の効果**

**15:55** ○中島進吾[1]，　後藤真里[2]，　深澤桂子[1]，　室伏　擴[1]，諸星俊郎[3]，室伏きみ子[1]（[1]お茶大ヒューマンウェルフェア，[2]お茶大ヒューマンライフ，[3]SANSHO 株式会社）

**3A02p09　Notch シグナルによってマスト細胞が獲得する抗原提示細胞様の形質**

**16:10** ○中野信浩[1]，西山千春[1,2]，奥村　康[1]，小川秀興[1]（[1]順天堂大院・医，[2]東京理科大・基礎工）

**3A02p10　シアル酸認識レクチンシグレック F のマウスマクロファージにおける発現調節**

**16:25** ○西島謙一，樋口廣士，村瀬佑介，立山博之，飯島信司（名大工）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**3A02p11　ヒト免疫グロブリン療法による B 細胞依存的細胞凝集を伴うリンパ球増殖抑制能の解析**

**16:50** ○堀　采音，藤村孝志，河本正次（広大院・先端）

**3A02p12　卵膜形成における ZP1 − ZP3 間相互作用と ZP1 の構造変化**

**17:05** ○奥村裕紀[1]，　武田祐真[1]，　栗山　亘[1]，　松田　幹[2]，氏田　稔[1]（[1]名城大農，[2]名大農）

**3A02p13　コンドロイチン硫酸はマウス前駆軟骨細胞の Alkaline phosphatase 活性を阻害する**

**17:20** ○工藤俊也，中谷祥恵，柿崎美里，新井愛衣，和田裕政，古旗賢二（城西大院・薬）

**3A02p14　霊長類味蕾オルガノイド培養系の確立**

**17:35** ○岩槻　健[1]，　難波みつき[1]，　熊木竣佑[1]，　大木淳子[1]，今井啓雄[2]，山根拓実[1]，大石祐一[1]　（[1]東農大応生，[2]京大霊長研）

**3A02p15　標的 RNA 配列特異的に結合する人工 PUF タンパク質のスクリーニングシステムの確立**

**17:50** ○原　知明，　森下しおみ，　戸川剛志，　前田遥香，進藤彰子，世良貴史（岡大工）

**3A02p16　能動的標的化能をもつ抗体提示型バイオナノカプセルの高効率細胞内取り込みメカニズム**

**18:05** ○李　　昊，立松健司，黒田俊一（大阪大学産業科学研究所）

## A03 会場　午前の部（9:20〜11:45）

食品―食品化学－糖質，脂質―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**3A03a01　高純度コレステロールの生産**

**9:20** ○石野暢好，中塚宏志，中塚進一（長良サイエンス株式会社）

**3A03a02　リシン欠乏飼料を用いた魚類筋肉における n-3 系脂肪酸の効率的な蓄積技術**

**9:35** ○吉永葉月[1]，　潮　秀樹[1]，　高橋伸一郎[1]，　芳賀　穣[2]，佐藤秀一[2]（[1]東大院農，[2]海洋大）

**3A03a03　高純度オメガ-3 ドコサペンタエン酸(DPA)のイコサペンタエン酸(EPA)からの化学合成**

**9:50** ○田畑　宏，対馬忠広，藤井　淳，平　哲郎，斎藤志保，三宅和弘，三澤嘉久，大谷昌士，馬場直道　（備前化成株式会社）

**3A03a04　ヨメガカサガイ(*Cellana toreuma*)の卵巣に由来する新規な奇数鎖ジエン酸の構造**

**10:05** ○川島英城（岩手県立大宮古短大部）

**3A03a05　質量分析を用いた粉乳に含まれる脂質糖化産物の分析法の構築**

**10:20** ○伊藤隼哉[1]，　小舘　愛[1]，　乙木百合香[1]，　加藤俊治[1]，池田郁男[2]，宮澤陽夫[3,4]，仲川清隆[1]（[1]東北大院農・機能分子解析，[2]東北大院農・食品化学，[3]東北大・未来科学技術共同研究センター，[4]東北大院農・食の健康科学ユニット）

**a06〜a09 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**3A03a06　石川県の食品と農産物から分離された乳酸菌が生産する菌体外多糖の分析**
**10:45**　○本多裕司，巻田春香，松本健司，小柳　喬（石川県大・生資環）

**3A03a07　*Parachlorella kessleri* stratin KNK-A001（カネカクロレラ）から得られたマクロファージ刺激作用を有する多糖体に関する研究**
**11:00**　○上野幹憲[1]，　平田成実[1]，　山下憲司[2]，　山口健一[1]，小田達也[1]（[1]長崎大院・水環，[2]株式会社カネカ）

**3A03a08　腸管上皮由来フィブロネクチンと相互作用するペクチン部分構造の解明**
**11:15**　○中　智美，宮本茉由，山根菜摘，北口公司，矢部富雄（岐阜大・応生科）

**3A03a09　消化管機能に対するセルロースナノファイバーの生体適合性**
**11:30**　○中山裕介，　山野上実希，　森島美千代，　小川剛伸，桝田哲哉，谷　史人（京大農）

## A03 会場　午後の部（14:00〜18:20）

食品―食品化学－糖質，脂質，食品化学－色素，香料―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**3A03p01　Emulsifiers affecting on the thermal properties of rice flour in gluten-free wonton formula**
**14:00**　○Petcharat PRAKAYWATCHARA，Chatchai WATTANAPHAIROJ，Doungjai THIRATHUMTHAVORN（Silpakorn Univ.）

**3A03p02　澱粉のゲル化に対するオキソ酸の影響**
**14:15**　○星野優人，上沢七海，伊藤　博，小林厚志（日大工）

**3A03p03　イネ種子の胚乳細胞壁形成に関わる新規分子の機能解析**
**14:30**　○緑川景子[1]，　黒田昌治[2]，　石丸喜朗[1]，　阿部啓子[1,3]，朝倉富子[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]農研機構・中央農研，[3]神奈川科学技術アカデミー）

**3A03p04　人乳由来糖タンパク質に存在する *O*-マンノシル型糖鎖構造**
**14:45**　○仲村絵里香[1]，　宮竹瑞貴[1]，　深谷真一[2]，　汲原章民[2]，北口公司[1]，矢部富雄[1]（[1]岐阜大・応生科，[2]アサヒグループ食品㈱）

**3A03p05　ガラクトシルグリセロールのヒト表皮角化細胞と神経系細胞への保護効果の検討**
**15:00**　○田谷郁実，井上絢葵，山田康枝（近大工）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**3A03p06　Lentzea 属放線菌由来新規 trehalose 類縁体 lentztrehalose 類の構造と生物活性**
**15:25**　○和田俊一，　澤　竜一，　大庭俊一，　波多野和樹，染野哲也，　久保田由美子，　梅北まや，　林　千草，　飯島希昌子，渋谷優子，川田　学，五十嵐雅之（微生物化学研究所）

**3A03p07　シングルアンカー型イソマルトメガロ糖におけるケルセチン-3-*O*-*β*-グルコシド可溶化に寄与する糖質構造の決定**
**15:40**　○土生慎二，ラングビーラヌッチ，熊谷裕也，貞廣樹里，植草聡太，田上貴祥，奥山正幸，原　博，木村淳夫（北大農）

**3A03p08　市販納豆および豆類に含まれる *α*-ガラクトオリゴ糖類の定量分析**
**15:55**　○石川千秋，森光康次郎（お茶大院ライフ）

**3A03p09　エゴマ由来機能性オリゴ糖の分析**
**16:10**　○竹内萌恵[1]，加島隆洋[2]，鈴木　寿[2]，北口公司[1]，矢部富雄[1]（[1]岐阜大・応生科，[2]岐阜県産業技術センター）

**3A03p10　米粉パンの発酵および糖消長について**
**16:25**　○奥西智哉[1]，　土川瀬里奈[2]，　翠川美穂[2]，　林　徹[2]，堀　清純[3]，岡留博司[1]，五月女格[1]，安藤泰雅[1]（[1]農研機構食品研，[2]聖徳大学，[3]農研機構次世代開発セ）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**3A03p11　麹甘酒の含有糖成分の同定**
**16:50**　○小黒芳史[1]，　西脇俊和[2]，　小林和也[2]，　信田亮太[1]，倉橋　敦[1]（[1]八海醸造・研究開発，[2]新潟農総研・食研セ）

**3A03p12　海藻製品中の単糖の迅速分析**
**17:05**　○垣田浩孝[1,2]，小比賀秀樹[2]（[1]日大文理，[2]産総研健康工学）

**3A03p13　ピロロチアゾール系メイラード色素の生物活性と食品中の分布**
**17:20**　○野田響子[1]，寺沢なお子[2]，島村裕子[3]，村田容常[1]（[1]お茶大，[2]金沢大，[3]静岡県大）

**3A03p14　ペントース系メイラード反応の褐変における 4-ヒドロキシ-5-メチル-3(*2H*)-フラノン（HMFO）の役割**
**17:35**　○中村美月，村田容常（お茶大）

**3A03p15　D-Xylose-Glycine 系メイラード反応における新奇赤色色素化合物の同定**
**17:50**　○川端真由，泉　雄斗，渡辺寛人，早瀬文孝（明治大農）

**3A03p16　アマドリ転位化合物が及ぼす D-キシロース系メイラード反応への影響**
**18:05**　○泉　雄斗，川端真由，横関俊昭，渡辺寛人，早瀬文孝（明治大農）

## A04 会場　午前の部（9:20〜12:00）

食品―食品化学－タンパク質，アミノ酸，食品化学－その他―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**3A04a01　カラムスイッチングを用いたキラルアミノ酸分析システムの検討**
**9:20**　○渡辺　淳[1]，　宇野由紀[1]，　箕畑俊和[1]，　寺田英敏[1]，飯田順子[1]，中野洋介[2]，福崎英一郎[2]（[1]島津製作所，[2]大阪大院工）

**3A04a02　食品中の D-アミノ酸分析に資する LC-MS/MS 法の開発**
**9:35**　○中野洋介，紺屋　豊，谷口百優，福崎英一郎（阪大工）

**3A04a03　食材中の遊離アミノ酸組成表の構築および調理過程での遊離アミノ酸の動態の検討**
**9:50**　○伊藤日向子[1]，植野洋志[2]，菊崎泰枝[1]　（[1]奈良女子大院，[2]龍谷大農）

**3A04a04　カイワレダイコンにおけるジャスモン酸メチルによるアミノ酸蓄積**
**10:05**　○野下浩二，田母神繁（秋田県大・生資科）

**3A04a05　タウリンによる遺伝子発現制御機構の解析**
**10:20**　○和多利研二[1]，井前正人[2]，薩　秀夫[1]（[1]前工大工，[2]大正製薬㈱）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**3A04a06　じゃがいもの新規機能性成分探索に向けたフラクションライブラリーの作製**
**10:45**　○野川俊彦[1]，　二村友史[1]，　岡野亜紀子[1]，　石原克之[2]，須藤麻里[2]，伊藤政喜[2]，長田裕之[1]（[1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー，[2]カルビー㈱）

**3A04a07　じゃがいもフラクションライブラリーを用いた抗糖化活性の検討**
**11:00**　○須藤麻里[1]，　吉原潮梨[1]，　石原克之[1]，　野川俊彦[2]，二村友史[2]，岡野亜紀子[2]，伊藤政喜[1]，長田裕之[2]　（[1]カルビー㈱，[2]理研 CSRS／ケミカルバイオロジー）

**3A04a08　アルコール飲料中における新規抗酸化製剤の作用と乳化安定性**
**11:15**　○門脇章夫，原田翔太，大久保泰宏（太陽化学株式会社）

**3A04a09　日本生まれのフレーバーホップ「ソラチエース」の特徴香について**
**11:30**　○谷川篤史[1]，　實方綾子[2]，　蛸井　潔[1]，　松本一郎[1]，中山康行[1]（[1]サッポロビール株式会社，[2]サッポロホールディング株式会社）

**3A04a10　甘味抑制物質ラクチゾール及びその誘導体に対する甘味抑制能の検証**

**11:45** ○中北智哉[1]，　石田明子[2]，　小林拓也[1]，　広川貴次[3]，橋本　誠[2]，三坂　巧[4]　([1]京大院・医，[2]北大院・農，[3]産総研，[4]東大院農生科・応生化)

## A04 会場　午後の部（14:00〜18:20）

食品―食品化学－その他―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**3A04p01　フラボノイドの分子会合に寄与する構造特性**
**14:00** ○豊島亮太，辻　　愛，坂本裕香，川畑球一，石井剛志（神戸学院大栄養）

**3A04p02　ブドウ果実の水溶性フェノール化合物と酵素による剥皮性についての品種間差の検討**
**14:15** ○堀西朝子[1]，　児玉祥基[1]，　滝沢　潤[2]，　竹内正彦[2]，尾崎嘉彦[1]（[1]近大・生物理工，[2]長野県農工研）

**3A04p03　RAPD 法を用いた国産ザクロの遺伝子パターンと機能性成分に関する検討**
**14:30** ○佐藤沢子，成澤直規，竹永章生（日大院・生資科）

**3A04p04　腸内細菌群によるウロリチン類の生成機構に関する研究(1)**
**14:45** ○工藤眞丈，中島賢則，山本浩明（㈱ダイセル）

**3A04p05　IL-12 産生を誘導する *Lactobacillus crispatus* KT-11 株由来表層タンパクの特性付け**
**15:00** ○渡邉　樹，榊原正樹，友清　帝，飛田啓輔（株式会社キティー）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**3A04p06　ビールのキレに及ぼすレトロネーザルアロマの影響**
**15:25** ○宮下聖子，　春名謙一郎，　菊池かおり，　岸本　徹，小林　稔，渡邊哲也（アサヒビール株式会社）

**3A04p07　ビールのイソ α 酸組成の最適化による苦味のキレ制御**
**15:40** ○岸本　徹，女川裕司，宮下聖子，小林　稔，渡邊哲也（アサヒビール㈱酒類技術研究所）

**3A04p08　ビールのオフフレーバーである 2-mercapto-3-methyl-1-butanol の前駆体の同定**
**15:55** ○野場重都[1]，　八子奈々[1]，　坂井浩晃[2]，　小林　稔[1]，渡邊哲也[1]　([1]アサヒビール，[2]アサヒグループホールディングス)

**3A04p09　シマグワワインの NMR メタボローム解析**
**16:10** ○稲村勇雅[1]，　久米田博之[1,2]，　熊木康裕[1]，　大西裕季[1]，菊川峰志[1,2]，　出村　誠[1,2]，　小山朗夫[3]，　伊東昌章[4]，　岩波俊介[5]，相沢智康[1,2]（[1]北大院先端生命，[2]北大 GI-CoRE ソフトマター GS，[3]浦添市シルバー人材センター，[4]沖縄高専，[5]苫小牧高専）

**3A04p10　固相誘導体化法を用いた黒コショウの GC/MS メタボローム解析手法**
**16:25** ○恩田浩幸[1]，　杉立久仁代[2]，　佐々野僚一[3]，　松尾俊介[3]，佐川岳人[1]，福崎英一郎[4]（[1]エスビー食品，[2]アジレント・テクノロジー，[3]アイスティサイエンス，[4]阪大院・工・生命先端）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**3A04p11　セシウムおよびストロンチウムによる内部被曝を軽減化する食品素材・成分の探索**
**16:50** ○上原祐也[1]，　石塚加奈[2]，　島村裕子[1,2]，　保田倫子[1,2]，下位香代子[1,2]，増田修一[1,2]　([1]静岡県大院薬食，[2]静岡県大食栄)

**3A04p12　微生物の分解活性を利用したメラノイジンの部分構造の解析**
**17:05** ○油井拓哉[1]，島村裕子[1]，本間清一[2]，増田修一[1]（[1]静岡県大食品栄養科学，[2]お茶大食物栄養）

**3A04p13　グリセルアルデヒド由来新奇架橋型 AGEs の同定**
**17:20** ○藤本汐莉[1]，臼井照幸[2]，早瀬文孝[1]，渡辺寛人[1]（[1]明治大，[2]女子栄養大）

**3A04p14　加熱処理が小麦アレルゲンの消化性に与える影響**
**17:35** ○友竹浩之，岩瀬彩香（飯田女子短大）

**3A04p15　シカ肉の調理・加工によるイミダゾールジペプチドの変化**
**17:50** ○近藤(比江森)美樹[1]，植田玲奈[1]，長尾久美子[2]　([1]徳島文理大人間生活，[2]徳島文理大短大)

**3A04p16　食品成分表の国際間比較研究－日米－**
**18:05** ○石本祐子，竹崎江里，甲斐達男（西南女学院大）

## A05 会場　午前の部（9:35〜11:45）

食品―食品工学－保蔵，安全性―

**a02〜a05 発表者の接続時間 9:25〜9:35**

**3A05a02　バイオフィルム破壊活性を有する食材の探索**
**9:35** ○塚谷忠之，末永　光，川口友彰，黒田理恵子（福工技セ・生食研）

**3A05a03　食中添加物によるサルモネラのバイオフィルム形成阻害機構の解明**
**9:50** ○立石実麗[1]，Md Tariqul Islam[3]，小椋　彩[1]，森永憲子[1]，益田時光[2]，本城賢一[2]，宮本敬久[2]　([1]九州大学大学院 生物資源環境科学府 生命機能科学専攻 食料化学工学教育コース 食品衛生化学研究室，[2]九州大学大学院 農学研究院 生命機能科学部門 食料化学工学講座 食品衛生化学研究室，[3]Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, University of Rajshahi)

**3A05a04　Antibacterial Effect of Essential Oils, Modified Atmosphere Packaging, and their Combination against Microorganisms in Fresh Produce**
**10:05** ○Jeong-Eun Hyun，　Sun-Young Lee，　Jae-Hyun Yoon，Jin-Ha Hwang，Yun-Sun Choi，Aerum Han（Chung-Ang University）

**3A05a05　食品工業における様々な環境負荷を低減するイオン半導体および関連技術の開発と応用**
**10:20** ○田村健治（首都大・産技高専品川）

**a06〜a09 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**3A05a06　アドミッタンス解析に基づく水晶振動子マイクロバランス法によるステンレス鋼表面上のタンパク質付着層形成過程に関する研究**
**10:45** ○萩原知明，　ナッタウッドボースリー，　柴田真理朗，崎山高明（東京海洋大食品）

**3A05a07　Effects of different freezing and thawing methods on quality preservation of *Pleurotus eryngii***
**11:00** ○TONG LI[1]，　Jo-Won Lee[1]，　Yena Heo[1]，　MinJoo Kim[1]，Jongkee Kim[2]，BoKyung Moon[1]　([1]Department of Food and Nutrition, Chung-ang University, [2]Department of Integrative Plant Science, Chung-Ang University)

**3A05a08　Effect of different cooking conditions on biogenic amines in *Doenjang***
**11:15** ○Yena Heo，　So Hee Yoon，　Ji Hyun Park，　Xueru Hai，Bokyung Moon（Department of Food and Nutrition, Chung -Ang University）

**3A05a09　生鮮ウニの新規保存法検討に関する研究**
**11:30** ○北村楓子，宮脇長人，鈴木　徹（東京海洋大院）

## A05 会場　午後の部（14:00〜18:20）

食品―食品工学－製造工学，食品工学－その他―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**3A05p01　ナルトビエイの粕漬けに関する研究**
**14:00** ○福田　翼，祇園雄大，辰野竜平，古下　学（水産機構水大校）

**3A05p02　乾燥熟成牛肉(ドライエイジングビーフ)中の香気成分の生成に与える微生物(カビ)の影響**
**14:15** ○山田朱里[1]，　市川宗一郎[1]，　宮嶋浩輝[1]，　跡部美樹雄[2,3]，村上周一郎[1,3]（[1]明治大農，[2]㈱フードイズム，[3]㈱ミートエポック）

**3A05p03　「さつま砂糖漬け鯛」の製造法に関する研究**
**14:30** ○内山晃一，川野純平，辰野竜平，古下　学，前田俊道，福田　翼（水産機構水大校）

**3A05p04　短波帯交流加熱による豆乳の殺菌**
**14:45**　○植村邦彦，高橋千栄子（農研機構）
**3A05p05　短時間吸水大豆における KTI と BBI の経時的な遺伝子発現変動と，プロテアーゼ阻害活性について**
**15:00**　○田村倫子，阿久澤さゆり，村　清司（東農大・応生・健康）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**3A05p06　高カカオチョコレート共存下のビフィズス菌 BB536 増殖促進作用**
**15:25**　○稲垣宏之[1]，平尾千波[2]，西村栄作[1]（[1]森永製菓株式会社，[2]株式会社森永生科学研究所）
**3A05p07　乳酸菌の菌体外多糖類生産に及ぼす添加物の影響**
**15:40**　○齊田実紗[1]，大政健史[2,3]（[1]徳島大院・先端技術，[2]徳島大院・生物資源産業学研，[3]阪大院・工）
**3A05p08　製パンに適したパネットーネ酵母と乳酸菌ペアの選抜に関する研究**
**15:55**　○甲斐達男[1]，石本祐子[1]，西園　葵[1]，長藤信哉[2]，吉野精一[3]（[1]西南女学院大，[2]㈱大賀薬局，[3]辻製菓専門学校）
**3A05p09　発酵乳製品用風味強化剤としての Aspergillus oryzae の応用に関する研究**
**16:10**　○細野　誠[1]，　齋藤千春[4]，　谷口悠子[4]，　小林　謙[2]，若松純一[2]，木村　彰[3]，玖村朗人[2]（[1]北大農，[2]北大院農，[3]雪印メグミルク，[4]会社員）
**3A05p10　ホエイ固形培地上における食用 Penicillium 属由来のリパーゼ産生**
**16:25**　○佐藤恵実[1]，　町谷泰紀[1]，　早川　徹[1]，　曾根輝雄[1]，若松純一[1]，木村　彰[2]，玖村朗人[1]（[1]北大院農，[2]雪印メグミルク）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**3A05p11　アルコール類がショ糖ステアリン酸エステル／水／食用油系の状態図及び乳化性に与える影響**
**16:50**　○合谷祥一[1]，松浦傳史[2,3]，小川晃弘[3]，中西真穂[1]（[1]香川大農，[2]愛媛大院連農，[3]三菱化学フーズ）
**3A05p12　レモン飲料における，風香味および糖・酸含量の嗜好性への影響**
**17:05**　○丸山弘明[1,3]，荒木茂樹[1]，中島美樹[2]，坂井信之[3]（[1]サッポロホールディングス㈱，[2]ポッカサッポロフード＆ビバレッジ㈱，[3]東北大）
**3A05p13　Release rate of allyl sulfide from cyclodextrin inclusion complex powders**
**17:20**　○Thi Van Anh NGUYEN[1,2,3]，Hidefumi YOSHII[2,3]（[1]Hue University of Agriculture and Forestry, [2]Ehime Univ., [3]Kagawa Univ.）
**3A05p14　乳化 *d*-リモネン噴霧乾燥粉末からの *d*-リモネン徐放速度に及ぼす賦形剤の影響**
**17:35**　○吉井英文[1]，高重至成[1]，四日洋和[2]，安達修二[3]（[1]香大農，[2]京都学園大，[3]京大農）
**3A05p15　Comparison of 1-MCP Release From Inclusion Complex and Coating Paper Under Exposure of Linear Ramping Humidity**
**17:50**　○HERMAWAN DWI ARIYANTO，　SHOTA INAHATA，HIDEFUMI YOSHII（Kagawa Univ.）
**3A05p16　生理計測によるチョコレートアイスクリームバーの評価**
**18:05**　○岩井　大[1]，　有澤英司[1]，　渡部加苗[1]，　井上恵介[1]，池田三知男[1]，堀　一浩[2]，小野高裕[2]（[1]森永乳業・研究本部，[2]新潟大学大学院医歯学総合研究科）

## A06 会場　午前の部（9:20〜12:00）

食品―食品機能・栄養－神経，内分泌，味覚・食欲―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**3A06a01　ストレス誘導性記憶の減衰の改善・予防―牡蠣抽出物―**
**9:20**　○松田　桂[1]，木屋佳奈恵[2]，松田芳和[3]，河村幸雄[1,2]（[1]京女大・院，[2]京女大，[3]日本クリニック㈱）
**3A06a02　ローヤルゼリーの抗うつ様効果に関する基礎的研究**
**9:35**　○家垣典幸[1]，　成田幸夫[1]，　服部徳子[1]，　森田（平田）洋子[2]，市原賢二[1]（[1]アピ㈱長良川リサーチセンター，[2]岐阜大院・連合創薬）
**3A06a03　コラーゲン由来抗うつペプチドの同定およびその脳脊髄液への移行**
**9:50**　○永井研丞，東　奈央，水重貴文，蕪山由己人（宇都宮大農）
**3A06a04　ビタミン E 欠乏食摂取がマウスの不安行動に与える影響**
**10:05**　○渡邊　佑，遠藤　駿，竹中麻子（明治大農）
**3A06a05　エイコサペンタエン酸とドコサヘキサエン酸の抗不安作用の比較検討**
**10:20**　○大島靖世[1]，　渡邊　佑[1]，　渡辺　剛[2]，　長田恭一[1]，竹中麻子[1]（[1]明治大農，[2]タマ生化学㈱）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**3A06a06　日本酒成分の NMDA 型グルタミン酸受容体への効果**
**10:45**　○矢吹　智[1]，　則包潔人[1]，　立溝博也[1]，　伊豆英恵[2]，山田康枝[1]（[1]近畿大院　システム工学研究科，[2]酒類総合研究所）
**3A06a07　食肉成分カルノシンによるエクソソームを介した脳腸相関活性化**
**11:00**　○杉原由佳[1]，門岡桂史[2]，片倉喜範[3]　（[1]九大院・生資環，[2]日本ハム株式会社中央研究所，[3]九大院・農院）
**3A06a08　アンセリン投与によるアルツハイマー病モデルマウスの記憶機能改善効果について**
**11:15**　○塩谷秋子，金子　順，久恒辰博（東大新領域）
**3A06a09　鶏肉イミダゾールジペプチドの高齢者の脳老化改善に対する効果**
**11:30**　○谷川輝虎[1]，　丁　瓊[1]，　金子　順[1]，　戸塚　護[2]，片倉喜範[3]，今林悦子[4]，松田博史[4]，久恒辰博[1]（[1]東大新領域，[2]東大農，[3]九大農，[4]国立精神神経医療研究センター）
**3A06a10　睡眠の質改善素材：清酒酵母による肌質改善作用とそのメカニズム解析**
**11:45**　○永盛友樹[1]，　岡　謙吾[1]，　物井則幸[1]，　岩本　拓[1]，尾林裕子[1]，翠川辰行[1]，村越倫明[1,2]，内山　章[1]，裏出良博[3]（[1]ライオン㈱，[2]京都府立医科大，[3]筑波大 WPI-IIIS）

## A06 会場　午後の部（14:00〜18:20）

食品―食品工学－加工学―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**3A06p01　各種の湿熱処理玄米の物理化学特性の評価**
**14:00**　○中村澄子[1]，奥村寿子[2]，菅原正義[2]，大坪研一[1]（[1]新潟薬大応用生命，[2]長岡高専）
**3A06p02　抗体を用いた残存糖層検出技術の開発**
**14:15**　○大倉哲也[1]，　藻寄　茜[2]，　峯岸恭孝[2]，　織田　健[3]，岩下和裕[3]（[1]農研機構　食研，[2]ニッポンジーン，[3]酒類総研）
**3A06p03　炊飯米を利用した高濃度ゲルの硬化過程に及ぼす品種特性の影響**
**14:30**　○佐々木朋子，　松木順子，　與座宏一，　杉山純一，前田英郎，重宗明子，安東郁男，徳安　健（農研機構）
**3A06p04　Effects of modified starches on product quality of prawn crackers produced by the drying process.**
**14:45**　○Chatchai WATTANAPHAIROJ，　Doungjai THIRATHUMTHAVORN，Prasong SIRIWONGWILAICHAT，Eakaphan KEOWMANEECHAI　（Silpakorn Univ.）
**3A06p05　Comparison of release behavior of flavor encapsulated in *Saccharomyces cerevisiae* and maltodextrin powder**
**15:00**　○Afroza SULTANA[1,2,3]，　Yusuke TANAKA[4]，　Yoshiya FUSHIMI[4]，Hidefumi YOSHII[1,2]（[1]Ehime Univ., [2]Kagawa Univ., [3]Chittagong Veterinary and Animal Sciences Univ., [4]Fuji Foods Corp.）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**3A06p06　Physical stability of squalene oil in spray-dried powder**
**15:25**　○Asmaliza ABD GHANI[1,2,3]，Hirokazu SHIGA[4]，Shuji ADACHI[5]，Hidefumi Yoshii[1,2]（[1]Ehime Univ., [2]Kagawa Univ., [3]Univ. Sultan Zainal

Abidin, Malaysia, [4]Kyoto Gakuen Univ., [5]Kyoto Univ.）

**3A06p07　コンブ類における不溶性および水溶性食物繊維の分別分析**

**15:40**　○高谷直己[1]，　紙谷年昭[1]，　戸田登志也[1]，　青江誠一郎[2]（[1]フジッコ株式会社，[2]大妻女子大）

**3A06p08　乳酸発酵工程の数値化に関する研究**

**15:55**　○豊嶋瑠美子，　森　大輝，　中嶋奎太，　大木梓織，石川匡子，張　　菡，陳　介余，秋山美展（秋田県立大学）

**3A06p09　小麦粉代替ドウによるメイラード反応の検討とその評価**

**16:10**　○小木曽加奈[1]，　寺尾啓二[3]，　古根隆広[3]，　岡崎光雄[2]（[1]長野県短大生活科学，[2]岡崎酒造㈱，[3]㈱シクロケムバイオ）

**3A06p10　小麦リポキシゲナーゼのグルテニンサブユニット中ポリペプチド構成に与える影響**

**16:25**　○浅水一久[1]，佐藤甫之[1]，白石　玲[2]，椎葉　究[1,2]（[1]東京電機大学大学院，[2]東京電機大学）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**3A06p11　組換えコムギ LOX2 の発現，精製および分析**

**16:50**　○佐藤甫之[1]，　今村未央[1]，　浅水一久[1]，　白石　玲[2]，川崎　寿[2]，夏目　亮[2]，椎葉　究[2]（[1]東京電機大学大学院，[2]東京電機大学）

**3A06p12　湯種生地の温度が澱粉及びタンパク質に与える影響**

**17:05**　○杉山貴洋[1]，松宮健太郎[1]，吉田　匡[2]，松村康生[1]（[1]京大院・農，[2]㈱日清製粉グループ本社・基礎研究所）

**3A06p13　ナットウ等各種粘性食材を用いたグルテンフリーパンの製造研究**

**17:20**　○田原　彩[1]，竹内美貴[2]，中村智英子[2]，瀬口正晴[3]（[1]大阪成蹊短大，[2]神戸女子短大，[3]神戸女子大学家政）

**3A06p14　Alkaline Type and Egg Albumin Affecting on the Qualities of Gluten Free Alkaline Noodles**

**17:35**　○Suparut SUTHEEVES，Piyachat CHAI-UEA，Doungjai THIRATHUMTHAVORN（Silpakorn Univ.）

**3A06p15　The Effect of Hydrocolloids on Characteristics of Gluten-free Yeast Doughnut**

**17:50**　○Chanikorn KONGPANICHTRAKUL，Prasong SIRIWONGWILAICHAT（Silpakorn Univ.）

**3A06p16　冷凍ピザの抗酸化活性を高める加熱方法の研究**

**18:05**　○CHEUNG Lennie，冨田晴雄，竹森利和　（大阪ガス株式会社）

## A07 会場　午前の部（9:20〜12:00）

食品―食品機能・栄養－その他―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**3A07a01　*Lactobacillus casei* subsp. *casei* 327 摂取が健常女性の肌状態に与える影響**

**9:20**　○齊藤雄飛[1]，　丸山健太郎[1]，　池田麻純[2]，　朝長昭仁[3]，熊谷武久[1]　([1]亀田製菓㈱，[2](医)快晴会 しらゆり皮フ科・整形外科，[3](医)快晴会 田奈整形外科・外科）

**3A07a02　漬物由来乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* TK61406 の摂取が腸内環境，肌状態および集中力に及ぼす影響**

**9:35**　○森下美香，　西尾翔子，　伊與田哲也，　小室あゆ美，河本哲宏（東海漬物）

**3A07a03　抗ピロリ菌鶏卵抗体配合ヨーグルトのヒトボランティア試験による有効性の検証**

**9:50**　○堀江健二，坂下真耶，山下裕輔，金　武祚　（㈱ファーマフーズ）

**3A07a04　ビフィズス菌の摂取が幼児の下痢や感冒様症状の発症に与える影響の検討**

**10:05**　○柳澤尚武[1]，LAU Amy Sie-Yik[2]，小林洋大[1]，清水(肖)金忠[1]，LIONG Min-Tze[2]（[1]森永乳業株式会社，[2]マレーシアサインズ大学）

**3A07a05　洪水災害後の衛生環境悪化に起因する腹部症状と腸内細菌叢の関係およびビフィズス菌 M-63 摂取による精神状態の改善効果**

**10:20**　○菅原宏祐[1]，　小田巻俊孝[1]，　Yaacob Nurhazwany[2]，Liong Min Tze[3]，清水(肖)金忠[1]，Lee Yeong Yeh[2]（[1]森永乳業基礎研，[2]マレーシアサインズ大学医学研究科，[3]マレーシアサインズ大学産業技術研究科）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**3A07a06　Piceatannol の破骨細胞に及ぼす影響**

**10:45**　○藤原葉子[1,2]，　高　優子[1]，　田邉采佳[1]，　川和理恵[1]，石川朋子[2]，市　育代[1,2]，内田裕子[3]，齋　政彦[3]([1]お茶大食物，[2]お茶大 HLI 研，[3]森永製菓㈱）

**3A07a07　キノコに含まれるシリンガ酸はエストロゲンレセプター非依存的に骨粗鬆症モデルマウスの骨密度減少を抑制する**

**11:00**　○田中照佳[1]，　川口信久[2]，　財満信宏[1]，　森山達哉[1]，福田泰久[1]，白坂憲章[1]（[1]近畿大農，[2]一正蒲鉾）

**3A07a08　microRNA 発現を利用した骨芽細胞分化評価法の検討**

**11:15**　○伊藤智広[1]，赤尾幸博[2]（[1]三重大院 生資，[2]岐阜大院 連合創薬）

**3A07a09　グルコマンナンと難消化性オリゴ糖の摂取が高脂肪食摂取ラットの大腸 Alkaline phosphatase 活性と遺伝子発現に及ぼす影響**

**11:30**　○岡崎由佳子，家入千弓，前川真理，杉本佳奈　（藤女子大・人間生活）

**3A07a10　Agaro-oligosaccharide enhances tight junction of Caco-2 intestine epithelial cells**

**11:45**　○Jun Bai[1]，　Nanami Ichikawa[2]，　Kouji Karasawa[3]，　Ikuya Shirai[3]，Takehiko Sakai[3]，Takakazu Mitani[4]，Shigeru Katayama[2]，Soichiro Nakamura[2]（[1]Dep. of Agric. of Grad. Sch. of Shinshu Univ., [2]Fac. of Agric. Shinshu Univ., [3]Ina Food Industry CO.,Ltd., [4]Shinshu Univ. ICCER）

## A07 会場　午後の部（14:00〜18:20）

食品―食品機能・栄養－その他―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**3A07p01　自然薯ムカゴ抽出物の生理的機能性について**

**14:00**　○篠崎文夏[1]，　山下治之[2]，　亀井飛鳥[1]，　渡部由貴[1]，安岡顕人[1]，　嶋田耕育[1]，　近藤　香[1]，　近藤　隆[1]，　荒井綜一[1,3]，阿部啓子[1,2]（[1]KAST，[2]東大農，[3]東農大）

**3A07p02　セイヨウカノコソウが脂肪細胞分化と機能に与える影響**

**14:15**　○原田洸輔[1]，　今村ひよ子[1]，　中村夏芽[1]，　仁科淳良[2]，只石　幹[1]，清水　誠[1]，服部一夫[1]　([1]東農大応生科，[2]日大理工）

**3A07p03　米由来タンパク加水分解物のジペプチジルペプチダーゼ－ 4 阻害作用**

**14:30**　○川上賀代子[1]，守谷智恵[1]，畑中唯史[2]，坪井誠二[1]（[1]就実大薬，[2]岡山生物研）

**3A07p04　消化管オルガノイドに対するアミノ酸の影響**

**14:45**　○齋藤由季，　岩槻　健，　羽生ひかる，　丸山奈月，只石　幹，清水　誠，服部一夫（東農大応生科）

**3A07p05　レジスタンス運動における γ-アミノ酪酸（GABA）とホエイプロテイン共摂取による筋肥大へ与える効果**

**15:00**　○坂下真耶[1]，　中村唱乃[1]，　堀江健二[1]，　堀江典子[1]，横山靖浩[2]，金　武祚[1]，藤田　聡[3]（[1]㈱ファーマフーズ，[2]三菱商事㈱，[3]立命館大学・スポーツ健康科学）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**3A07p06　レチノイン酸受容体 γ 応答遺伝子が骨格筋肥大に及ぼす影響**

**15:25**　○北風智也[1]，　嶋田有沙子[1]，　原田直樹[1]，　石川孝博[2]，山地亮一[1]　([1]大阪府大院・生命環境，[2]島根大・生資科・生命工）

**3A07p07　β-コングリシニンの摂取が高血圧自然発症ラットの血圧および脂質濃度に及ぼす影響**

**15:40**　○川邊田晃司[1]，　岩永ひかり[2]，　岡田愛子[2]，　湯浅正洋[2]，古場一哲[1,2]　([1]長崎県大院 人間健康科学，[2]長崎県立大 栄養健康）

**3A07p08　脳梗塞重症化予防効果を持つ食品成分探索のための新**

規バイオマーカーの開発
**15:55** ○田熊彩子[1]，齊藤芳和[1]，阿部　新[2]，石丸喜朗[1]，上田雅之[4]，仁藤智香子[2]，木村和美[2]，阿部啓子[1,3]，朝倉富子[1]（[1]東大院・農生科，[2]日医大，[3]KAST，[4]多摩総医セ）

**3A07p09　老化促進マウスにおけるカルノシン酸の肝臓及び腎臓保護効果**
**16:10** ○柴田紗知[1]，石飛博之[2]，奥田真友美[1]，味八木茂[2]，萱島知子[3]，川岡知博[4]，松原主典[1]（[1]広島大・院 教育，[2]広島大病院・未来医療センター，[3]佐賀大・文化教育，[4]川岡クリニック）

**3A07p10　老化促進マウスにおける酒粕機能成分の抗老化効果及び作用機構の検討**
**16:25** ○奥田真友美[1]，柴田紗知[1]，飯島遼平[2,3]，伊豆英恵[2]，藤井　力[2,3]，松原主典[1]（[1]広島大院・教育，[2]酒総研，[3]広島大院・生物圏）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**3A07p11　テオフィリンによるグルココルチコイド受容体を介した IL-6 の発現抑制作用**
**16:50** ○三谷塁一[1]，片山　茂[2]，中村宗一郎[2]（[1]信州大・先鋭領域融合，[2]信州大院・総合理工（農学））

**3A07p12　酸味受容体（ASICs）タンパクをセンサーとした酸味抑制物質のスクリーニング**
**17:05** ○玉村朋大[1]，柴田泰宏[2]，塚本義則[1]，鵜川眞也[2]（[1]中部大院応生，[2]名市大院医）

**3A07p13　カシスアントシアニンによる神経細胞障害保護作用の検討**
**17:20** ○上野有紀，三浦叶子，夏目梨冴，大澤俊彦（愛知学院大心身科学）

**3A07p14　GABA，クワンソウ，及びラフマ抽出物の共摂取による睡眠改善効果**
**17:35** ○山津敦史[1]，中村唱乃[1]，坂下真耶[1]，堀江健二[1]，堀江典子[1]，齋藤洋子[2]，玉城美根子[2]，金　武祚[1]（[1]㈱ファーマフーズ，[2]㈱シャルレ）

**3A07p15　パッションフラワー抽出物による概日リズム振幅増強作用及び睡眠改善作用**
**17:50** ○下田博司，戸田一弥，竹田翔伍，清水稔仁（オリザ油化）

**3A07p16　植物由来コロソリン酸の新規機能性－体内時計調節機能－**
**18:05** ○鈴木千尋[1]，間　和彦[1]，小堀真珠子[2]，大池秀明[2]（[1]日本製粉㈱，[2]農研機構/食品研）

## A08 会場　午前の部（9:20〜12:00）

食品―食品機能・栄養－メタボリック・シンドローム，エネルギー代謝―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**3A08a01　脂肪酸添加加熱による難消化性処理澱粉の分子構造変化**
**9:20** ○大木梓織[1]，中嶋奎太[2]，森　大輝[2]，豊嶋瑠美子[2]，石川匡子[1,2]，秋山美展[1,2]（[1]秋田県大生物資源，[2]秋田県大院生物資源）

**3A08a02　Study on functional food factors that hamper bile acid transport into liver**
**9:35** ○Tzuwen HONG，Tsutomu HASHIDUME，Takashi SASAKI，Makoto SHIMIZU，Jun INOUE，Ryuichiro SATO（The Univ. of Tokyo）

**3A08a03　低炭水化物食摂取下の肥満マウス肝臓に見られる脂質代謝関連遺伝子の発現変化**
**9:50** ○奥田徹哉（産総研 生物プロセス）

**3A08a04　胎児期低タンパク質食暴露が成長後仔マウスの耐糖能・脂質代謝異常を誘導する**
**10:05** ○三好　萌[1]，大谷りら[2]，斉藤憲司[2]，賈　慧娟[2]，加藤久典[2]（[1]東大院・農生科・応用生化，[2]東大・総括）

**3A08a05　高脂肪食摂取マウスの白色脂肪組織においてグルココルチコイドによって誘導されたリポ多糖結合タンパクが炎症に寄与する**
**10:20** ○関　真実[1]，苫米地由香[1]，斉藤伸一[2]，園山　慶[2]（[1]北大院・生命，[2]北大院・農）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**3A08a06　レスベラトロールの食後高脂血症改善作用の解析**
**10:45** ○佐藤　綾[1]，高橋真美[1]，勝間田理恵[2]，井上博文[2]，室田佳恵子[3]，河田照雄[4]，上原万里子[2]，高橋信之[2]（[1]東京農業大学大学院農学研究科食品栄養学専攻，[2]東京農業大学応用生物科学部食品安全健康学科，[3]近畿大学理工学部生命科学科，[4]京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻）

**3A08a07　ヒメウコギ *Eleutherococcus sieboldianus* 中の抗糖尿病性フラボノイドと抗肥満性テルペノイド**
**11:00** ○仁科淳良[1]，板垣匡哉[1]，鈴木　孝[2]，早川　智[3]，纐纈　守[4]（[1]日大理工，[2]日大薬，[3]日大医，[4]岐阜大工）

**3A08a08　チョウザメ由来コラーゲンペプチドは体内で糖代謝促進作用を示す**
**11:15** ○笹岡友季穂，岸村栄毅（北大水）

**3A08a09　ラットにおけるピセアタンノールの血糖値上昇抑制作用**
**11:30** ○織谷幸太[1]，興津　輝[2]，西村栄作[1]，齋　政彦[1]，竹内昌治[2]（[1]森永製菓㈱，[2]東大生産研）

**3A08a10　咀嚼機能を向上させるグミゼリーの特徴**
**11:45** ○小野寺雅彦[1]，藤原茂弘[2]，鈴木　潔[1]，堀　一浩[2]，小野高裕[2]（[1]ユーハ味覚糖㈱，[2]新潟大院・医歯学）

## A08 会場　午後の部（14:00〜18:20）

食品―食品機能・栄養－メタボリック・シンドローム，エネルギー代謝―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**3A08p01　Flavan 3-ols 投与によって誘導されるストレス応答反応の検証**
**14:00** ○藤井靖之，川越　藍，志籐隼祐，越阪部奈緒美（芝浦工業大学）

**3A08p02　ホップ由来ビール苦味成分イソ α 酸の肥満に伴う認知機能低下の改善効果**
**14:15** ○綾部達宏[1]，内田真一[2]，山田浩司[2]，阿野泰久[1]（[1]キリン㈱・健康研，[2]協和発酵キリン㈱・中枢研）

**3A08p03　db/db マウスにおける等カロリーの大豆油および魚油含有大豆油を含む低脂肪食と高脂肪食のエネルギー代謝および腹腔内脂肪に与える影響**
**14:30** ○池田郁男[1]，池田英介[1]，奥野綾夏[1]，佐藤歩実[1]，中村珠子[1]，中野　卓[1]，井上奈穂[2]（[1]東北大院農，[2]山形大農）

**3A08p04　フコースの肥満抑制効果**
**14:45** ○苑　　暁[1]，大原和幸[1]，佐藤根妃奈[1]，伊東美保[1]，小南友里[1]，潮　秀樹[1]，相澤光輝[2]，上野友哉[2]，松田秀喜[2]（[1]東大院農，[2]焼津水産化学）

**3A08p05　フコースが脂肪細胞分化・成熟に及ぼす影響**
**15:00** ○伊東美保[1]，苑　　暁[1]，大原和幸[1]，佐藤根妃奈[1]，小南友里[1]，潮　秀樹[1]，相澤光輝[2]，上野友哉[2]，松田秀喜[2]（[1]東大院農，[2]焼津水産化学工業㈱）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**3A08p06　表面加工玄米の継続摂取による脂質代謝改善効果の検討：リポタンパク質粒子サイズ解析に基づく血中脂質プロファイル**
**15:25** ○荒木理沙[1]，潮　玲子[2]，藤江敬子[1]，植山ゆかり[2]，鈴木浩明[1]，中田由夫[1]，橋本幸一[1]（[1]筑波大・医学医療系，[2]筑波大院・人間総合科学）

**3A08p07　SREBP 活性を抑制する食品成分の探索とその抑制機構の解析**
**15:40** ○岩瀬将盛，宮田慎吾，清水　誠，井上　順，佐藤隆一郎（東大院農生科・応生化）

**3A08p08　クルクミンが食餌性肥満モデルマウスの精巣上体脂肪**

組織に及ぼす影響
**15:55** ○小堀真珠子，　高橋弓子，　秋元由香里，　桜井　睦，大池秀明，木村俊之（農研機構食品研）

**3A08p09　1975 年型日本食摂取がヒトに与える効果**
**16:10** ○浅野将希[1]，　菅原沙恵子[1]，　串田　衛[1]，　遠又靖丈[2]，辻　一郎[2]，都築　毅[1]（[1]東北大院農，[2]東北大院医）

**3A08p10　*Lactobacillus gasseri* SBT2055 菌体の加熱処理が内臓脂肪蓄積抑制効果に及ぼす影響**
**16:25** ○三好雅也，小川哲弘，酒井史彦，門岡幸男（雪印メグミルク㈱）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**3A08p11　発酵乳ケフィアが筋肉細胞の機能に及ぼす効果**
**16:50** ○杉本龍郎[1]，　松元拓也[1]，　原田大輔[2]，　徳丸浩一郎[3]，白畑實隆[4]，照屋輝一郎[1,2,4]（[1]九大院シス生，[2]九大院生資環，[3]日本ケフィア，[4]九大院農院）

**3A08p12　β 2 アドレナリン受容体発現制御を介した食品成分による筋機能改善効果**
**17:05** ○近澤未歩，清水　誠，井上　順，佐藤隆一郎（東大院農生科・応生化）

**3A08p13　GPCR 活性制御を介した骨格筋機能改善効果を有する食品成分の探索**
**17:20** ○浦本麻里，近澤未歩，清水　誠，井上　順，佐藤隆一郎（東大院農生科・応生化）

**3A08p14　PGC-1 α や FOXO1 を用いた骨格筋機能評価系の構築**
**17:35** ○守田昭仁[1]，　長池祐太[1]，　竹内彩夏[1]，　中川　匠[1]，望月祐介[1]，亀井康富[2]，三浦進司[1]（[1]静岡県大食品栄養，[2]京都府大生命環境）

**3A08p15　Protein Kinase Inhibitor による筋萎縮抑制作用**
**17:50** ○中川　匠[1]，　守田昭仁[1]，　竹内彩夏[1]，　長池祐太[1]，佐山音緒[1]，　渡辺優衣[1]，　小郷尚久[1]，　浅井章良[1]，　亀井康富[2]，三浦進司[1]（[1]静岡県大院，[2]京都府立大生命環境）

**3A08p16　卵白ペプチドによる運動模倣効果が筋肥大を促進する**
**18:05** ○松原　守[1]，　鈴木智之[1]，　坂下真耶[3]，　伊納義和[2]，古野忠秀[2]，堀江健二[3]，金　武祚[3]（[1]京都学園大・バイオ環境，[2]愛知学院大・薬，[3]株式会社ファーマフーズ・開発部）

## B09 会場　午前の部（9:20〜12:00）

食品―食品機能・栄養－酸化，抗酸化，糖化，抗糖化，老化―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**3B09a01　抱合酵素発現酵母株を用いたメチル化ケルセチン抱合代謝物の合成**
**9:20** ○生城真一，岩本明日夏，藤井美春，西川美宇，濱田昌弘，中島範行，安田佳織，榊　利之（富山県大・工・生物工）

**3B09a02　異なるモデル動物におけるエステル化フェルラ酸およびカフェ酸の抗老化作用**
**9:35** ○丹治典子[1]，　宮崎穂菜実[3]，　橋友理香[4]，　三谷塁一[2]，米倉真一[2]，片山　茂[1]，中村宗一郎[1]（[1]信州大院・農，[2]信州大・先鋭領域融合，[3]信州大院・総合工，[4]信州大農）

**3B09a03　ケトン体(3-ヒドロキシ酪酸)の化粧品としての効能**
**9:50** ○盤若明日香[1]，　西村　拓[1]，　松下　功[1]，　坪田　潤[1]，河田悦和[2]（[1]大阪ガス，[2]産総研）

**3B09a04　カドミウムの脳機能障害に関する研究**
**10:05** ○吉城由美子，和田恭平，田中陽祐，アラッツアロサス，嵯峨絢花，福井里奈（石川県大）

**3B09a05　アミロイド線維形成を阻害するアシル化キナ酸類の合成**
**10:20** ○石原健広[1]，　渡邊紀之[1]，　山田智美[1]，　尾山公一[2]，重光佳基[3]，　天野名都子[3]，　廣明秀一[3]，　近藤忠雄[1]，　吉田久美[1]（[1]名大院情報科学，[2]名大物国セ，[3]名大院創薬）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**3B09a06　高脂肪食によるマウス聴力老化の遅延**
**10:45** ○大池秀明，　伊藤奈々子，　桜井　睦，　神山かおる，小堀真珠子（農研機構／食品研）

**3B09a07　腸間膜リンパ節樹状細胞および T 細胞のレチノイン酸に関わる応答の加齢による変化**
**11:00** ○高野智弘[1,2]，　上滝隆太郎[1,2]，　宮川拓也[1]，　朴　知賢[1]，塩河亜弥[1,2]，好田　正[3]，足立(中嶋)はるよ[1,2]，田之倉優[1]，八村敏志[1,2]（[1]東大院農生科・応生化，[2]東大院農生科・食の安全研セ，[3]東農工大農・応生化）

**3B09a08　中高齢マウスを用いた餌中タンパク質含量の違いによる筋再生への影響**
**11:15** ○増冨裕文[1,2]，　糸山隆一[3]，　石原克之[3]，　伊藤政喜[3]，石神昭人[1]（[1]都健康長寿研，[2]東医歯大・院医歯，[3]カルビー㈱）

**3B09a09　タンパク質合成制限による細胞老化制御機構の解析**
**11:30** ○高氏裕貴[1,2]，　圓　敦貴[1]，　三木健輔[1,2]，　鮎沢　大[1,2]，藤井道彦[1]（[1]横浜市大生命ナノ，[2]イチバンライフ㈱）

**3B09a10　初代培養アストロサイトにおける味噌抽出物の BDNF 産生促進効果**
**11:45** ○有村美紗[1]，三谷塁一[2]，片山　茂[1]，中村宗一郎[1]（[1]信州大農，[2]信州大先鋭領域融合）

## B09 会場　午後の部（14:00〜18:20）

食品―食品機能・栄養－酸化，抗酸化，糖化，抗糖化，老化，食品機能・栄養－癌，抗癌―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**3B09p01　スクロースの高温加熱によって生成するポリフェノール－ HHQ より疎水性のポリフェノールの同定－**
**14:00** ○野島祥子，亀田和美，増田俊哉（大阪市大院生活）

**3B09p02　焼き調理によるナスのポリフェノール抽出量変化と重量変化の相関性**
**14:15** ○内田健太郎[1]，ズエブニキタ[2]，竹森利和[1]（[1]大阪ガス，[2]ブリティッシュコロンビア大）

**3B09p03　ポリフェノールおよびシステイン類によるカツオ肉の鮮赤色の維持研究**
**14:30** ○冨重蓮華，本田沙理，増田俊哉（大阪市大院生活）

**3B09p04　セサモールを用いたアフィニティークロマトグラフィーの作成と S2 細胞由来タンパク質の精製**
**14:45** ○玉巻沙季子，工藤絵美，勝崎裕隆（三重大院・生資）

**3B09p05　*Lactobacillus gasseri* SBT2055 の細胞ストレス抵抗性に対する影響**
**15:00** ○中川久子[1]，小畠英史[2]，松原由美[1]，宮崎忠昭[1]（[1]北大遺，[2]雪印メグミルク㈱）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**3B09p06　パン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* が産生する betanin 分解抑制物質のシリカゲル TLC 板を用いた評価および探索**
**15:25** ○浅野純一，橋床泰之（北大院農）

**3B09p07　タンパク質に生成する架橋型メイラード反応後期段階生成物の分析**
**15:40** ○岡部脩平[1]，臼井照幸[2]，渡辺寛人[1]，早瀬文孝[1]（[1]明治大農，[2]女子栄養大栄養）

**3B09p08　アシュワガンダの機能性成分ウィザノライド類に着目した研究(第 1 報)機能性成分を増加させる栽培条件の検討**
**15:55** ○和田光生[1]，田村和也[2]（[1]大阪府立大学，[2]ダイダン㈱）

**3B09p09　アシュワガンダの機能性成分ウィザノライド類に着目した研究(第 2 報)ウィザノライド類の含有量と抗がん作用の関係**
**16:10** ○田村和也[1]，和田光生[2]，カウルスニル[3]，レヌーワダワ[3]（[1]ダイダン株式会社，[2]大阪府大，[3]産総研）

**3B09p10　米ぬか成分を活用した相乗的な癌細胞増殖阻害**
**16:25** ○永塚貴弘[1]，舘脇直人[1]，西田浩志[1]，仲川清隆[2]，宮澤陽夫[3,4]

（[1]新潟薬大・応用生命，[2]東北大院農・機能分子解析学，[3]東北大・未来科学技術共同研究センター，[4]東北大院農・食の健康科学ユニット）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**3B09p11　徳島県産食用植物のガン細胞増殖抑制**
**16:50**　○金丸　芳[1]，生杉　笙[2]，小山保夫[1]，横井川久己男[1]（[1]徳島大院生物資源，[2]徳島大院総合科学）

**3B09p12　ウルシを含む植物抽出物のヒト由来白血病細胞の増殖抑制およびアポトーシス誘導作用**
**17:05**　○富田　剛[1]，　比留間航[1]，　門倉一成[1]，　宮田彩香[1]，関野由弘[1]，駿河康平[1]，村井　妙[2]，小松靖弘[3,4]（[1]株式会社紀文食品，[2]キンダーケア動物病院，[3]有限会社サン自然薬研究所，[4]北里大学）

**3B09p13　がん細胞スフェロイドに対する酵素消化低分子化フコイダン抽出物の抗腫瘍効果**
**17:20**　○徳永佐和[1]，江藤　博[2]，白畑實隆[3]，照屋輝一郎[1,3]（[1]九大院シス生，[2]第一産業，[3]九大院農院）

**3B09p14　酵素消化低分子化フコイダン抽出物および抗がん剤の併用による抗腫瘍効果**
**17:35**　○平田千尋[1]，　江藤　博[2]，　吉田年宏[3]，　白畑實隆[4]，照屋輝一郎[1,4]　（[1]九大院生資環，[2]第一産業，[3]吉田クリニック，[4]九大院農院）

**3B09p15　mRNA 成熟阻害活性を指標とした抗ガン活性化合物の探索**
**17:50**　○森本茉莉[1]，北野敦子[2]，鶴岡諒子[2]，増田誠司[1]（[1]京大・生命，[2]京女大・家政）

**3B09p16　CYP2E1 の遺伝子多型がニトロソアミンの代謝活性化に与える影響に関する研究**
**18:05**　○藤山友里[1]，今石浩正[2]（[1]神大院農，[2]バイオシグナル総合研究セ）

## B10 会場　午前の部（9:20〜12:00）

食品―食品機能・栄養－免疫，炎症，アレルギー・アレルゲン―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**3B10a01　ライチ由来低分子化ポリフェノール Oligonol の抗炎症効果**
**9:20**　○河合咲紀[1]，　林　洪太[1]，　長田恭一[1]，　高成　準[2]，北舘健太郎[2]（[1]明治大農，[2]株式会社アミノアップ化学）

**3B10a02　野沢菜の発酵による免疫調節機能の増強と関与する乳酸菌の解析**
**9:35**　○濵島知里[1]，山本佳奈[1]，大角友貴[1]，髙橋楓香[1]，鈴木弥生[1]，渡辺　純[2]，田中沙智[1]（[1]信州大農，[2]農研機構・食総研）

**3B10a03　免疫調節機能に対する野沢菜漬け摂取の影響**
**9:50**　○田中沙智[1]，　山本佳奈[1]，　濵島知里[1]，　鈴木弥生[1]，寺島　真[2]，杉山陽司[3]（[1]信州大農，[2]株式会社ワンネスサポート，[3]株式会社まるたか）

**3B10a04　*Lactobacillus plantarum* 06CC2 摂取による免疫賦活に及ぼす影響と腸内環境に与える効果について**
**10:05**　○李　怡然[1]，竹下正彦[1]，松崎竜也[1]，ﾂｪﾝﾄﾞｱﾕｼｭﾁｭﾙﾝﾊﾞｯﾄ[2]，ｵﾕﾝｽﾚﾝﾂｪﾝﾄﾞｽﾚﾝ[3]，宮原広典[4]，上村修司[5]（[1]南日本酪農協同，[2]蒙科技大，[3]蒙バイオ協会，[4]鹿児島県厚生連健康管理センター，[5]鹿児島大学医）

**3B10a05　*Pediococcus acidilactici* K15 株のヒト末梢血由来樹状細胞に対する免疫賦活効果**
**10:20**　○碇　茉穂[1]，　川島忠臣[1]，　久保田芳郎[2]，　下条直樹[3]，辻　典子[4]（[1]キッコーマン㈱研究開発本部，[2]キッコーマン㈱キッコーマン総合病院，[3]千葉大院 医学研究院 小児病態学，[4]産総研バイオメディカル研究部門）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**3B10a06　免疫系の老化を定量的に評価するための指標の確立**
**10:45**　○小方優弥，細井瑳耶佳，久能涼子，須田瞭太，榎本　淳（群大院理工）

**3B10a07　光センシングによる簡便な生体内抗酸化能評価システムの開発**
**11:00**　○數村公子[1]，　土屋広司[1]，　原　顕子[1]，　竹内康造[1]，美和登志幸[1]，服部将貴[2]，森下直計[3]，大澤俊彦[4]（[1]浜松ホトニクス・中研，[2]浜松ホトニクス・開発本部，[3]浜松ホトニクス・電子管，[4]愛知学院大・心身）

**3B10a08　マスト細胞の成熟過程における転写因子 C/EBP α の発現制御**
**11:15**　○岩月美桜乃[1]，　高橋恭子[1]，　芳賀真矢[1]，　堀　大峰[1]，笠倉和巳[1,2]，花澤重正[1]（[1]日大生物資源，[2]東京理科大基礎工）

**3B10a09　カルノシンの腸管バリア増強効果**
**11:30**　○大津　出[1]，藤井　薫[1]，佐藤三佳子[2]，片倉喜範[3]（[1]九大院シス生，[2]日本ハム中央研究所，[3]九大院 農院）

**3B10a10　抗酸化剤によるタンパク質の自然抗体エピトープへの変換**
**11:45**　○河村沙絵[1]，古橋麻衣[1]，畑佐行紀[1]，柴田貴広[1]，内田浩二[1,2]（[1]名大院・生命農，[2]東大院・農学生命）

## B10 会場　午後の部（14:00〜18:20）

食品―食品機能・栄養－免疫，炎症，アレルギー・アレルゲン―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**3B10p01　フラボノイドによるビフィズス菌の抗炎症活性増強メカニズムおよび活性成分に関する解析**
**14:00**　○川畑球一[1]，　萩原光太[2]，　馬場信行[2]，　石井剛志[1]，大東　肇[2]，村上　茂[2]（[1]神戸学院大栄養，[2]福井県大・生物資源）

**3B10p02　免疫賦活効果を有する *Leuconostoc mesenteroides* NTM048 株由来菌体外多糖の構造解析**
**14:15**　○松崎千秋[1]，　杉原美乃里[1]，　桑原美沙[1]，　苫米地祐輔[1]，Lennart Forsberg[2]，　Parastoo Azadi[2]，　松本健司[1]，　加藤紀彦[3]，糸乗　前[4]，山本憲二[1]，久　景子[1,5]（[1]石川県大，[2]ジョージア大，[3]京大院・生命，[4]滋賀大・教育，[5]日東薬品工業㈱）

**3B10p03　Feeding exopolysaccharides from Leuconostoc mesenteroides NTM048 reduces chronic kidney diseases through protection of intestinal tight junction barrier in mice.**
**14:30**　○Hung Tran Van[1]，　Hisa Keiko[2]，　Yonejima Yasunori[2]，Suzuki Takuya[1]（[1]Department of Biofunctional Science and Technology, Hiroshima Univ., [2]Research and Development Department, Nitto Pharmaceutical Industries, Ltd.）

**3B10p04　*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2038 株及び *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* 1131 株による腸管における抗菌ペプチドの発現誘導メカニズム**
**14:45**　○小林杏輔，狩野　宏，浅見幸夫（㈱明治）

**3B10p05　乳酸菌 *Lactobacillus gasseri* SBT2055 の RS ウイルス増殖抑制効果**
**15:00**　○江口　慧[1]，　浮辺　健[1]，　河野通生[1]，　關　敬弘[1]，馬場一信[2]，　猪村　帝[2]，　田中くみ子[2]，　松原由美[2]，　中川久子[2]，宮崎忠昭[2]（[1]雪印メグミルク株式会社・ミルクサイエンス研究所，[2]北海道大学・遺伝子病制御研究所）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**3B10p06　腸内細菌叢による GABA 産生の解析**
**15:25**　○楢林ひかり，　高橋恭子，　坪井瑞季，　杉　由高，中田一彰，倉岡克弥，藤佑志郎，松藤　寛，花澤重正（日大生物資源科学部）

**3B10p07　大豆サポニンの接触過敏症抑制効果における腸内細菌叢の作用**
**15:40**　○長野隆男[1]，　亀崎彩紗[1]，　三宅沙知[1]，　片瀬　満[2]，津村和伸[2]，後川　潤[3]，齊藤峰輝[3]，矢野博己[4]，松田　幹[5]（[1]川崎医福大臨床栄養，[2]不二製油，[3]川崎医大微生物，[4]川崎医福大健康体育，[5]名大生命農）

**3B10p08　小腸パイエル板細胞による IgA 産生応答における腸内**

細菌及びレチノイン酸による修飾作用
**15:55** ○石井涼太[1]，石井俊祐[1]，津田真人[1]，高橋恭子[2]，八村敏志[3]，細野　朗[1]，上野川修一[1]（[1]日大生資科・食品生命，[2]日大生資科・応用生命，[3]東大院農生科・食の安全研究セ）

**3B10p09　Caco-2 細胞における牛乳カゼインミセルの細胞内消化と経細胞極性輸送：LC-MS/MS による定量的解析**
**16:10** ○櫻井那央，西尾俊亮，秋山友香，大島健司，灘野大太，松田　幹（名大院・生命農）

**3B10p10　食物繊維ペクチンによるパイエル板ミエロイド細胞の活性化制御機構の解析**
**16:25** ○石其慧太[1]，北口公司[1,2]，矢部富雄[1,2]（[1]岐阜大院・連農・生資科，[2]岐阜大・応生科・応用生命）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**3B10p11　大腸リンパ節特徴的に存在する自然リンパ球の解析**
**16:50** ○畑井俊哉[1]，上滝隆太郎[2]，津田真人[1]，高橋恭子[1]，細野　朗[1]，八村敏志[2]（[1]日大 生資科，[2]東大院 農生科 食の安全研セ）

**3B10p12　結腸リンパ節における T 細胞分化の特徴**
**17:05** ○石濱史也[1]，津田真人[1]，小熊俊生[1]，村木悠平[1]，於　鉄崢[1]，八村敏志[2]，高橋宜聖[3]，高橋恭子[1]，上野川修一[1]，細野　朗[1]（[1]日大生資科，[2]東大院農生科・食の安全研セ，[3]感染研・免疫）

**3B10p13　バイオグリコーゲンは腸管細胞への刺激を介してアレルギーを抑制する**
**17:20** ○吉岡泰淳[1]，古屋敷隆[2]，芦田　均[3]（[1]神戸大院・科技イノベ，[2]江崎グリコ㈱・健康科学研究所，[3]神戸大院・農）

**3B10p14　経口免疫寛容における抗原特異的濾胞性ヘルパー T 細胞の解析**
**17:35** ○芝原恭子[1,2]，高橋宜聖[3]，八村敏志[1,4]（[1]東大院農生科・食の安全研セ，[2]日本学術振興会特別研究員，[3]感染研・免疫，[4]東大院農生科・応生化）

**3B10p15　低分子量 GTP アーゼを介した腸管上皮透過性の調節機構**
**17:50** ○中田一彰，高橋恭子，杉　由高，小早川哲朗，楢林ひかり，松尾大介，牛島直哉，津田真人，細野　朗，上野川修一，花澤重正（日本大学生物資源科学部）

**3B10p16　消化管上皮の亜鉛トランスポーター ZIP5 の発現制御解析と消化管バリア機能への役割**
**18:05** ○松尾　樹[1]，神戸大朋[2]，鈴木卓弥[1]（[1]広島大院・生物圏科学，[2]京大院・生命・統合生命科学）

## C11 会場　午前の部（9:20〜12:00）

有機化学，天然物化学―天然物－生合成，代謝―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**3C11a01　Heterologous production of a fungal RiPP asperipin-2a**
**9:20** ○Ying Ye[1]，Taro Ozaki[2]，Atsushi Minami[2]，Yuya Igarashi[1]，Myco Umemura[4]，Masayuki Machida[4]，Miho Izumikawa[5]，Kazuo Shin-ya[5]，Katsuya Gomi[3]，Hideaki Oikawa[2]（[1]Graduate School of Chemical Science and Engineering, Hokkaido Univ., [2]Graduate School of Science, Hokkaido Univ., [3]Graduate School of Agricultural Science, Tohoku Univ., [4]Bioproduction Research Institute, AIST, [5]Biomedicinal Information Research Center, JBIC）

**3C11a02　ustiloxin 系糸状菌 RiPPs のゲノムマイニング**
**9:35** ○五十嵐祐也[1]，叶　英[1]，尾崎太郎[2]，南　篤志[2]，五味勝也[3]，及川英秋[2]（[1]北大院総化，[2]北大院理，[3]東北大院農）

**3C11a03　麹菌異種発現系を用いた Abscisic Acid の生合成研究(3)**
**9:50** ○小崎拓登[1]，南　篤志[2]，五味勝也[3]，及川英秋[2]（[1]北大院総化，[2]北大院理，[3]東北大院農）

**3C11a04　麹菌発現系を利用した構造類似テルペンの網羅的ゲノムマイニング**
**10:05** ○成田興司[1]，工藤洸星[1]，叶　英[1]，南　篤志[2]，児玉基一郎[3]，五味勝也[4]，及川英秋[2]（[1]北大院総化，[2]北大院理，[3]鳥取大院農，[4]東北大院農）

**3C11a05　麹菌異種発現系を用いた PKS-NRPS 由来天然物の生合成研究**
**10:20** ○劉　成偉[1]，山根桃華[2]，尾崎太郎[1]，南　篤志[1]，及川英秋[1]（[1]北大院理，[2]北大院総化）

**a07〜a10 発表者の接続時間 10:50〜11:00**

**3C11a06　講演取消**

**3C11a07　病原菌感染や植物ホルモン処理がイネにおけるフェニルアミド類の蓄積に及ぼす影響**
**11:00** ○森本紀子[1]，上野琴巳[2]，寺石政義[3]，奥本　裕[3]，森　直樹[3]，石原　亨[2]（[1]鳥取大院農，[2]鳥取大農，[3]京大院農）

**3C11a08　一アミノ酸置換によるメバロン酸 3-キナーゼのジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼへの変換**
**11:15** ○本山賢人，吉村　徹，邊見　久（名大院生命農）

**3C11a09　非メバロン酸経路の中間体をドナー基質としたプレニル基転移酵素の反応**
**11:30** ○林　佳史, 伊藤智和, 吉村　徹, 邊見　久（名大院生命農）

**3C11a10　*Flavobacterium johnsoniae* 由来メバロン酸経路関連酵素の同定と機能解析**
**11:45** ○早川　祝，祖父江史明，吉村　徹，邊見　久（名大院生命農）

## C11 会場　午後の部（14:00〜18:20）

有機化学，天然物化学―天然物－生合成，代謝―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**3C11p01　メチルイソシアネートの脱離を伴う特異な変換反応を触媒する糸状菌由来酵素シクロペナーゼの発見と機能解析**
**14:00** ○岸本真治，石川格靖，原　幸大，山田陽香，平山裕一郎，橋本　博，恒松雄太，渡辺賢二（静岡県大薬）

**3C11p02　立体選択的な環化反応を触媒する酵素 CghA の反応機構解析**
**14:15** ○横山　葵，岸本真治，佐藤道大，原　幸大，恒松雄太，橋本　博，渡辺賢二（静岡県大薬）

**3C11p03　イネにおけるフェアリー化合物の新プリン代謝経路上での生合成に関する研究**
**14:30** ○崔　宰熏[1,2]，伏見圭司[3]，成川　礼[2,3]，平井浩文[1,2]，浅川倫宏[4]，稲井　誠[5]，菅　敏幸[5]，河岸洋和[1,2,6]（[1]静大院農・応生化，[2]静大・グリーン研，[3]静大・理，[4]東海大・創造，[5]静県大・薬，[6]静大院・創造）

**3C11p04　フェアリー化合物 ICA の代謝に関する化学的研究**
**14:45** ○松崎信生[1]，崔　宰熏[2,3]，平井浩文[2,3]，近藤　満[3]，稲井　誠[4]，浅川倫宏[5]，菅　敏幸[4]，河岸洋和[1,2,3]（[1]静大院・創造，[2]静大院農・応生化，[3]静大・グリーン研，[4]静県大・薬，[5]東海大・創造）

**3C11p05　フェアリー化合物 AHX と AOH に対する糖転移酵素に関する研究**
**15:00** ○近藤遼一[1]，澤田　梓[1]，崔　宰熏[1,2]，平井浩文[1,2]，浅川倫宏[3]，稲井　誠[4]，菅　敏幸[4]，河岸洋和[1,2,5]（[1]静岡大院・総合農，[2]静岡大・グリーン研，[3]東海大・創造，[4]静岡県大・薬，[5]静岡大院・創造）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**3C11p06　コムラサキシメジ(*Lepista sordida*)におけるフェアリー化合物の生合成経路に関する研究**
**15:25** ○伊藤彰将[1]，寺島百合香[1]，崔　宰熏[1,2]，恒松雄太[3]，渡辺賢二[3]，鈴木智大[4]，平井浩文[1,2]，浅川倫宏[5]，稲井　誠[3]，菅　敏幸[3]，河岸洋和[1,2,6]（[1]静岡大院・総合農，[2]静岡大・グリーン研，[3]静岡県大・薬，[4]宇都宮大・バイオ，[5]東海大・創造，[6]静岡大院・創造）

**3C11p07　*Burkholderia contaminans* CH-1 株におけるフェアリー化合物 AOH の生成酵素について**
**15:40** ○杉浦　輝[1]，崔　宰熏[1,2]，徳山真治[1]，平井浩文[1,2]，稲井　誠[3]，浅川倫宏[4]，菅　敏幸[3]，河岸洋和[1,2,5]（[1]静大院農・応

生化，[2]静大・グリーン研，[3]静県大・薬，[4]東海大・創造，[5]静岡大院・創造）

**3C11p08　高感度検出方法を用いたイネにおけるフェアリー化合物の定量化**
**15:55**　○竹村太秀[1]，　澤田　梓[2]，　伊藤彰将[2]，　崔　宰熏[1,2,3]，平井浩文[1,2,3]，稲井　誠[4]，菅　敏幸[4]，浅川倫宏[5]，河岸洋和[1,2,3,6]（[1]静大農・応生化，[2]静大院・総合農，[3]静大・グリーン研，[4]静岡県大・薬，[5]東海大・創造，[6]静岡大院・創造）

**3C11p09　冬虫夏草 *Cordyceps militaris* における cordycepin 生合成経路の研究**
**16:10**　○天内優子[1]，　崔　宰熏[1,2]，　恒松雄太[3]，　渡辺賢二[3]，道羅英夫[2]，鈴木智大[4]，河岸洋和[1,2,5]（[1]静大農・応生化，[2]静大・グリーン研，[3]静県大・薬，[4]宇都宮大・バイオ，[5]静大院・創造）

**3C11p10　β—アミリン合成酵素：W534, L734 及び Y736 残基の機能解析～CH-π 相互作用の可能性について～**
**16:25**　○相場悠圭里，渡辺拓海，星野　力，寺沢有里，仲野千秋（新潟大院自）

**p11～p16 発表者の接続時間 16:40～16:50**

**3C11p11　二環性トリテルペン/セスクアテルペン環化酵素の触媒機構の解析**
**16:50**　○村上瑞気，　TENKOVSKAIA LIUDMILA，　奥野琴音，上田大次郎，佐藤　努（新潟大院自然）

**3C11p12　納豆菌における tetraprenyl-β-curcumene 環化酵素の機能解析**
**17:05**　○高橋宏忠，上田大次郎，佐藤　努（新大院自然）

**3C11p13　ポリエンを生合成する II 型ポリケタイド合成酵素の in vitro 解析**
**17:20**　○杜丹ヤオ[1]，勝山陽平[1]，新家一男[2]，大西康夫[1]　（[1]東大院・農生科・応生工，[2]産業技術綜合研究所）

**3C11p14　ベンザスタチン類生合成におけるテトラヒドロキノリン環およびインドリン環形成機構の解析**
**17:35**　○堤　隼馬[1]，勝山陽平[1]，新家一男[2]，大西康夫[1]　（[1]東大院・農生科・応生工，[2]AIST）

**3C11p15　リベロマイシン生合成に関わる酸化還元酵素 RevM の機能解析**
**17:50**　○鬼頭奈央子[1]，　高橋俊二[1]，　宮澤　岳[1]，　前島　希[1]，田中美帆[1]，室井　誠[1]，奥村英夫[2]，熊坂　崇[2]，長田裕之[1]（[1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー，[2]高輝度光科学研究センター）

**3C11p16　リベロマイシン生合成に関わる RevM の結晶構造解析**
**18:05**　○奥村英夫[1]，　鬼頭奈央子[2]，　高橋俊二[2]，　宮澤　岳[2]，熊坂　崇[1]，長田裕之[2]　（[1]高輝度光科学研究センター，[2]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー）

## C12 会場　午前の部（9:20～12:00）

有機化学，天然物化学—合成，反応機構—

**a01～a05 発表者の接続時間 9:10～9:20**

**3C12a01　カスケードブロモ環化反応を用いた saxitoxin 骨格の新合成戦略：(+)-decarbamoyl-α-saxitoxinol の全合成**
**9:20**　○上野壮平，中崎敦夫，西川俊夫（名大院生命農）

**3C12a02　トリクロロアセトアミドからイソニトリルへの新規な一段階変換反応**
**9:35**　○宮坂忠親，橋本穂果，安立昌篤，西川俊夫（名大農）

**3C12a03　屋根付き *cis*-ジアミンの調製法**
**9:50**　○福田　怜[1]，福士幸治[2]（[1]北大農，[2]北大院農）

**3C12a04　環状デプシペプチドに含有する α, β-dihydroxy-γ-aminoheptanoic acid 誘導体の合成**
**10:05**　○東海林由憲，吉野　諒，今野博行（山形大院理工）

**3C12a05　1 段階反応による糖ヌクレオチドの合成**
**10:20**　○宮川　淳，外山沙那実，山村初雄（名工大工）

**a06～a10 発表者の接続時間 10:35～10:45**

**3C12a06　環境調和型水中ラクトン合成法の開発－ケト酸の新規脱ハロラクトン化反応－**
**10:45**　○知名秀泰，小島悠輔，天野雄太，土肥寿文（立命館大薬）

**3C12a07　Diphenyl Phosphorazidate を用いたアルドキシムからテトラゾールの効率的合成**
**11:00**　○石原稿太朗[1]，　川島麻友美[1]，　塩入孝之[1]，　松本高利[2]，松儀真人[1]（[1]名城大農，[2]東北大理）

**3C12a08　分子内立体ひずみを利用した高活性型 Grubbs-Hoveyda メタセシス触媒の開発**
**11:15**　○下脇健斗，　五十嵐里奈，　小林佑基，　杉山祐也，塩入孝之，松儀真人（名城大農）

**3C12a09　ユビキタス鉄サレン錯体を用いる孤立オレフィンの不斉エポキシ化反応：基質汎用性と反応機構の考察**
**11:30**　○杉山祐也，宮崎裕紀，宮田一誠，榊原有希，小林佑基，塩入孝之，松儀真人（名城大農）

**3C12a10　菌類が産生する機能性物質に関する研究（奨励賞受賞講演）**
**11:45**　○崔　宰熏　（静岡大学学術院農学領域）

## C12 会場　午後の部（14:00～18:20）

有機化学，天然物化学—合成，反応機構—

**p01～p05 発表者の接続時間 13:50～14:00**

**3C12p01　高効率合成を指向したリグナン及びテルペノイドの合成研究（奨励賞受賞講演）**
**14:00**　○森　直紀　（東京大学大学院農学生命科学研究科）

**3C12p02　Ancorinoside 類の合成研究**
**14:15**　○大木千明，矢島　新，勝田　亮，額田恭郎（東農大院農）

**3C12p03　青枯病菌のクオラムセンシング物質 HMCP の合成研究**
**14:30**　○橋村　奏[1]，　矢島　新[2]，　甲斐建次[3]，　勝田　亮[2]，額田恭郎[2]（[1]東農大院農，[2]東農大応生，[3]阪府大院生命環境）

**3C12p04　渦鞭毛藻から単離された amphidinin 類配糖体部位の合成研究**
**14:45**　○曽根実奈美[1]，矢島　新[2]，勝田　亮[2]，額田恭郎[2]（[1]東農大院農，[2]東農大応生）

**3C12p05　Oryzamide A 及び類縁体の合成研究**
**15:00**　○豊田麻実[1]，　勝田　亮[2]，　岩佐幸一[2]，　矢島　新[2]，額田恭朗[2]（[1]東農大院農，[2]東農大応生）

**p06～p10 発表者の接続時間 15:15～15:25**

**3C12p06　FE399 の合成と立体化学に関する研究**
**15:25**　○政田尚子[1]，勝田　亮[2]，矢島　新[2]，額田恭郎[2]（[1]東農大院農，[2]東農大応生）

**3C12p07　立体選択的なアミノパラデーションを用いた(－)-isosolenpsin と(＋)-monomorine の合成研究**
**15:40**　○武本夕貴子[1]，服部恭尚[2]，真壁秀文[1]（[1]信大院農，[2]京都薬科大，共同利用機器センター）

**3C12p08　アオウキクサ起源花芽誘導分子 LDS1 の合成と代謝物の探索**
**15:55**　○山田優作[1]，　土屋　諒[2]，　廣住操俊[1]，　竹本裕之[3]，佐藤浩平[1]，鳴海哲夫[1]，戸田三津夫[1]，大西利幸[2,3]，間瀬暢之[1,3]，渡辺修治[4]（[1]静大工，[2]静大農，[3]静大グリーン研，[4]静大創造科学技術大学院）

**3C12p09　オニヒトデステロイド配糖体の構造修飾と NGF 増強活性**
**16:10**　○岸　健太，原田翔太，長島志栞，小鹿　一（名大院・生命農）

**3C12p10　スルホシアル酸：抗インフルエンザ薬の次世代開発戦略**
**16:25**　○清田洋正，ヴァヴリカクリストファー，武藤千明，泉　実（岡山大院・環境生命）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**3C12p11　シクロペンタジエニルアニオンを有する天然色素 Juglorubin の全合成**
**16:50**　○加茂翔伍[1,2,3]，吉岡　快[1]，倉持幸司[1,2]，椿　一典[1]（[1]京府大院生命環境，[2]東理大理工，[3](独)日本学術振興会特別研究員 DC）

**3C12p12　Griseusin 類の合成研究**
**17:05**　○大倉涼貴，佐古尚裕，渡邉秀典（東大院農・応生化）

**3C12p13　Conosilane A の合成研究**
**17:20**　○岡村仁則，渡邉秀典（東大院農生科・応生化）

**3C12p14　抗マラリア活性を有する Myristicyclin 類の不斉合成研究**
**17:35**　○久保伸一郎，渡邉秀典（東大院農生科）

**3C12p15　Salinipostin A の合成研究**
**17:50**　○藤岡孝亘，渡邉秀典（東大院農）

**3C12p16　Dieckmann 縮合を用いた pseudolaric acid B の合成研究**
**18:05**　○森　直紀，間瀬千晶，赤松禎久，渡邉秀典（東大院農生科・応生化）

## C13 会場　午前の部（9:20〜11:45）

有機化学，天然物化学―天然物－単離構造決定－微生物―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**3C13a01　薬剤感受性出芽酵母を用いたミトコンドリアを標的とする 新規農薬リード化合物 decatamariic acid の取得**
**9:20**　○渡邊善洋[1]，須賀拓弥[1]，成沢里美[2]，横川怜美[2]，岩月正人[1,3]，野中健一[1,3]，　中島琢自[1,3]，　篠原康雄[4]，　塩月孝博[5]，　一丸直哉[6]，三芳秀人[7]，浅見行弘[1,3]，大村　智[3]，塩見和朗[1,3]（[1]北里大感染制御，[2]北里大理，[3]北里大生命研，[4]徳島大薬院，[5]農生資研，[6]京都学園大バイオ環境，[7]京大農院）

**3C13a02　微生物代謝産物からの抗マラリア活性物質の探索**
**9:35**　○深澤　航[1]，　岩月正人[1,2]，　野中健一[1,2]，　松本厚子[1,2]，石山亜紀[1,2]，　穂苅　玲[2]，　乙黒一彦[2]，　大村　智[2]，　塩見和朗[1,2]（[1]北里大感染制御，[2]北里大生命研）

**3C13a03　糸状菌 *Pochonia* sp. FKI-7537 株培養液抽出物から得られた新規化合物 pochoniolide A および B について**
**9:50**　○宮野　怜[1]，　松尾洋孝[2]，　野中健一[2]，　庭野吉己[3]，塩見和朗[2]，高橋洋子[2]，大村　智[2]，中島琢自[2]（[1]北里大院・感染制御，[2]北里大・生命研，[3]東北大院・歯）

**3C13a04　糸状菌を探索源とした physicochemical screening による新規物質の探索**
**10:05**　○松尾洋孝，野中健一，高橋洋子，大村　智，中島琢自（北里大・生命研）

**3C13a05　深海由来糸状菌培養物からの抗ミズカビ化合物の探索**
**10:20**　○高橋こなみ[1,2,3]，　酒井一成[2]，　長野由梨子[3]，　大類穂子[3]，Lima Andre O.[4]，　Pellizari Vivian H.[5]，　岩月正人[2,6]，　瀧下清貴[3]，野中健一[2,6]，藤倉克則[3]，大村　智[2]（[1]東京海洋大院，[2]北里大生命研，[3]海洋研究開発機構，[4]Vale do Itajai Univ.，[5]Sao Paulo Univ.，[6]北里大院感染制御）

**a06〜a09 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**3C13a06　放線菌の生産するアクチノロージン類縁化合物**
**10:45**　○菰田俊一，丸山　繭（宮城大 食産業）

**3C13a07　流木より分離した糸状菌 *Cylindrocarpon* sp. SY-39 株が生産する物質について**
**11:00**　○鈴木拓馬[1]，　吉田誠也[1]，　網干貴子[1]，　村山哲也[1]，小関卓也[1]，上杉祥太[2]，木村賢一[2]，塩野義人[1]（[1]山形大農，[2]岩手大院・連合農）

**3C13a08　3,4-Dihydroquinolizinium 環を有する新規天然物の単離，構造決定および生物活性評価**
**11:15**　○澤木裕紀，中川　優，木村高啓，戸村友彦，小鹿　一（名大院・生命農）

**3C13a09　クロイソカイメン共生菌が生産する新規有毒二次代謝産物の探索**
**11:30**　○菊池　颯，岡田華弥，長由扶子，山下まり，此木敬一（東北大農）

## C13 会場　午後の部（14:00〜18:05）

有機化学，天然物化学―天然物－単離構造決定－微生物―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**3C13p01　黒穂菌とマコモの共生に関する化学的研究**
**14:00**　○西山祐貴[1]，小堀　一[2]，崔　宰熏[3]，徳山真治[3]，平井浩文[3,4]，河岸洋和[2,3,4]（[1]静岡大院・総合農，[2]静大院・創造，[3]静大農・応生化，[4]静大・グリーン研）

**3C13p02　サケツバタケ（*Stropharia rugosoannnulate*）からの生体機能性物質の探索**
**14:15**　○清水俊吾[1]，　呉　　静[2]，　崔　宰熏[1,2]，　平井浩文[1,2]，河岸洋和[1,2,3]（[1]静大院農・応生科，[2]静大院・グリーン研，[3]静大院・創造）

**3C13p03　ヤマブシタケ（*Hericium erinaceus*）培養ろ液由来の生体機能物質の探索**
**14:30**　○内田和輝[1]，　呉　　静[2]，　崔　宰熏[1,2]，　徳山真治[1]，平井浩文[1,2]，河岸洋和[1,2,3]（[1]静大院・総合農，[2]静大・グリーン研，[3]静大院・創造）

**3C13p04　ヤマブシタケ胞子由来の生理活性物質の探索**
**14:45**　○石岡達朗[1]，　呉　　静[2]，　崔　宰熏[1,2]，　平井浩文[1,2]，河岸洋和[1,2,3]（[1]静大農・応生化，[2]静大・グリーン研，[3]静大院・創造）

**3C13p05　ナラタケ属の産生する生理活性物質に関する化学的研究**
**15:00**　○森　拓未[1]，　関谷　敦[2]，　呉　　静[3]，　崔　宰熏[1,3]，平井浩文[1,3]，河岸洋和[1,3]（[1]静大農・応生化，[2]森林総研，[3]静大・グリーン研）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**3C13p06　オオシロカラカサタケ由来の機能性物質の探索**
**15:25**　○大浦　健[1]，　呉　　静[2]，　崔　宰熏[1,2]，　平井浩文[1,2]，河岸洋和[1,2,3]（[1]静大農・応生化，[2]静大・グリーン研，[3]静大院・創造）

**3C13p07　Study on biologically functional compounds from the edible mushroom *Cortinarius caperatus***
**15:40**　○Arif Yanuaru RIDWAN[1]，Jing WU[2]，Jae-Hoon CHOI[1,2,3]，Hirofumi HIRAI[1,2,3]，Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3,4]（[1]Grad. Sch. of Integrated Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Fac. Agric., Shizuoka Univ., [4]Grad. Sch. of Sci. and Tech. Shizuoka Univ.）

**3C13p08　フェアリー化合物によるキノコ菌糸体の成長制御に関する研究**
**15:55**　○呉　　静[1,2]，　内田和輝[3]，　崔　宰熏[1,3]，　平井浩文[1,3]，菅　敏幸[4]，河岸洋和[1,3,5]（[1]静大・グリーン研，[2]日本学振，[3]静大院・総合農，[4]静県大・薬，[5]静大院・創造）

**3C13p09　スギヒラタケの産生する毒性物質に関する生化学的研究**
**16:10**　○稲吉里美[1]，　荒井勇人[1]，　鈴木智大[2]，　崔　宰熏[1,3]，道羅英夫[3]，恒松雄大[4]，渡辺賢二[4]，平井浩文[1,3]，河岸洋和[1,3,5]（[1]静大院・総合農，[2]宇都宮大学・バイオサイエンス教育研究センター，[3]静大・グリーン研，[4]静岡県大・薬，[5]静大院・創造）

**3C13p10　ツキヨタケ（Ompharotus guepiniformis）の子実体に含まれる成分について**
**16:25**　○青木聡樹，塩野義人，網干貴子，村山哲也（山形大農）

**p11〜p15 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**3C13p11　放線菌の生産する新規 48 員環マクロライドの構造**
**16:50**　○澤　竜一，　梅北まや，　波多野和樹，　林　千草，五十嵐雅之，梅沢洋二（微化研）

**3C13p12　深海底泥由来放線菌の生産する新規 enediyne 系抗生物質に関する研究**
**17:05**　○五十嵐雅之[1]，　澤　竜一[1]，　梅北まや[1]，　林　千草[1]，波多野和樹[1]，加藤千明[2]（[1]微化研，[2]海洋研究開発機構）

**3C13p13　オジギソウ窒素固定細菌 *Cupriavidus taiwanensis* は青枯病菌型とコレラ菌型のクオラムセンシング機構を 2 種有する**
**17:20**　◦脇本隆行，谷　修治，甲斐建次（阪府大院・生命環境）

**3C13p14　青枯病菌においてクオラムセンシング制御下にある PKS-NRPS が産生するリポペプチド ralsolamycin 類の単離・構造決定**
**17:35**　◦村井勇太[1]，森　祥子[2]，曳地康史[3]，甲斐建次[1]（[1]阪府大院・生命環境，[2]サントリー生命科学財団，[3]高知大・農）

**3C13p15　アズレンの光学特性を生かした新規 CD 励起子キラリティ試薬の開発**
**17:50**　◦奥　直也[1]，林　咲希[1]，村藤俊宏[2]，五十嵐康弘[1]（[1]富山県大生工セ・生物工，[2]山口大院創成科学）

## C14 会場　午前の部（9:20〜11:45）

有機化学，天然物化学―天然物－ケミカルバイオロジー，作用機構―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**3C14a01　久慈産琥珀に含まれる生物活性物質の精製法の改良と新規物質の探索**
**9:20**　◦高橋穂乃香[1]，　越野広雪[2]，　川村哲晃[3]，　清水栄作[3]，新田久男[4]，上杉祥太[5]，大野美紗[1]，木村賢一[1,3,5]　（[1]岩手大・農，[2]理研 CSRS，[3]岩手大院・農，[4]久慈琥珀㈱，[5]岩手大院・連合農）

**3C14a02　超臨界流体抽出法によって増加する久慈産琥珀の構成成分の解析**
**9:35**　◦川村哲晃[1]，　越野広雪[2]，　永澤佳之[3]，　七尾英孝[3]，白井誠之[3]，上杉祥太[4]，大野美紗[5]，木村賢一[1,4,5]（[1]岩手大院・農，[2]理研 CSRS，[3]岩手大・理工，[4]岩手大院・連合農，[5]岩手大・農）

**3C14a03　久慈産琥珀のメタノール抽出物と超臨界流体抽出物の生物活性の比較**
**9:50**　◦丸山美紅[1]，　川村哲晃[1]，　永澤佳之[2]，　七尾英孝[2]，白井誠之[2]，鈴木　聡[3]，上杉祥太[4]，大野美紗[5]，木村賢一[1,4,5]（[1]岩手大院・農，[2]岩手大・理工，[3]㈱実正，[4]岩手大院・連合農，[5]岩手大・農）

**3C14a04　新規オートファジー誘導物質(+)-エポジムノラクタムの構造活性相関**
**10:05**　◦岡戸祐治，上田一貴，重冨顕吾，生方　信（北大院農）

**3C14a05　安定同位体標識光反応性芳香族アミノ酸誘導体の合成**
**10:20**　◦橋本　誠，王　　磊，崎浜靖子，橋床泰之（北大院農）

**a06〜a09 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**3C14a06　過酸化水素；オビヤスデ目ヤスデの新規防御物質**
**10:45**　◦桑原保正[1]，　山口拓也[2]，　市来弥生[3]，　田辺　力[4]，浅野泰久[1]　（[1]富山県大・生工科・生工研セ，JST, ERATO，[2]筑波大・生命環境，[3]宮崎県農総試・食の安全分析セ，[4]熊本大・教育）

**3C14a07　Retarding activity of 6-(decanoylamino)-1,2,6-trideoxy-D-allose on plant growth**
**11:00**　◦Md Tazul Islam Chowdhury[1]，Hikaru Ando[2]，Ryo C. Yanagita[2]，Yasuhiro Kawanami[2]（[1]Ehime Univ.，[2]Kagawa Univ.）

**3C14a08　黒大豆種皮色素シアニジン 3-グルコシドへのフラブ-2-エン-3-オール 3-グルコシドの変換反応に関する研究**
**11:15**　◦中根悠輔，　TEPPABUT Yada，　林　英美，　近藤忠雄，吉田久美（名大院情報科学）

**3C14a09　ガロイル化フラバン-3-オール誘導体の合成と構造-活性相関研究**
**11:30**　◦法島太一[1]，米田慎吾[1]，中島範行[2]，齊藤安貴子[1]（[1]大阪電通大院工，[2]富山県立大工）

## C14 会場　午後の部（14:00〜18:20）

有機化学，天然物化学―天然物－ケミカルバイオロジー，作用機構―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**3C14p01　放射線増感作用を持つ化合物 SQAP は HDAC1 の発現を抑制する**
**14:00**　◦川久保悠史[1]，カルボネルヘスス[1]，紙透伸治[2]，佐原弘益[2]，倉持幸司[1]，菅原二三男[1]（[1]東理大・理工，[2]麻布大・獣医）

**3C14p02　青枯病菌クオラムセンシングシグナル分子はヒスチジンキナーゼ PhcS の膜貫通ドメインに受容される**
**14:15**　◦嶋谷美香[1]，　木場章範[2]，　大西浩平[3]，　曳地康史[2]，甲斐建次[1]（[1]阪府大院・生命環境，[2]高知大・農，[3]高知大・総研セ）

**3C14p03　PPM1 活性化物質は成熟脂肪細胞における脂肪滴の蓄積を抑制する**
**14:30**　◦鵜飼容子[1]，　佐竹一紘[1]，　中川　大[1]，　木村賢一[2]，大西素子[1]（[1]中部大学大学院応用生物学研究科，[2]岩手大・農）

**3C14p04　植物由来の生物活性ジテルペン化合物モミラクトンが酵母に与える生育抑制効果**
**14:45**　◦富田啓介[1]，　松尾安浩[2]，　川向　誠[2]，　野尻秀昭[1]，岡田憲典[1]（[1]東大・生物工学セ，[2]島根大・生物資源）

**3C14p05　dioctatin による Clp プロテアーゼ機能異常を介したアフラトキシン生産阻害機構**
**15:00**　◦古川智宏[1]，　片山秀和[2]，　市川琢万[2]，　飯村九林[1]，山本利義[1]，根岸瑠美[3]，鈴木道生[1]，作田庄平[1]　（[1]東大院・農生科・応生化，[2]東海大・工・生化，[3]東大・分生研）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**3C14p06　クルクミンが出芽酵母の薬剤排出およびその関連遺伝子の発現に与える影響**
**15:25**　◦山脇千佳[1]，　山口良弘[1,2]，　荻田　亮[1,3]，　田中俊雄[1]，藤田憲一[1]　（[1]阪市大院・理，[2]阪市大・複合先端，[3]阪市大・健康研セ）

**3C14p07　polygodial の殺真菌活性におけるアルデヒド基の役割**
**15:40**　◦高落裕介[1]，　荻田　亮[1,2]，　亀田宗矢[1]，　臼杵克之介[1]，藤田憲一[1]，田中俊雄[1]　（[1]阪市大院・理，[2]阪市大・健康研セ）

**3C14p08　ナギ科植物由来成分ナギラクトン E の抗真菌作用**
**15:55**　◦林　謙吾[1]，　山口良弘[1,2]，　荻田　亮[1,3]，　田中俊雄[1]，藤田憲一[1]（[1]阪市大院・理，[2]阪市大・複合先端，[3]阪市大・健康・研セ）

**3C14p09　出芽酵母のイソアミルアルコール誘導偽菌糸の微小管伸長不全における Kar9 の関与**
**16:10**　◦村田和加恵[1]，　山口良弘[2,3]，　荻田　亮[2,4]，　藤田憲一[2]，田中俊雄[2]（[1]米子高専物質，[2]阪市大院理，[3]阪市大複合先端，[4]阪市大健康研セ）

**3C14p10　低酸素誘導因子の分子間相互作用や転写活性に対する 4-O-メチルアスコクロリンの作用機序の解析**
**16:25**　◦近藤哲也[1]，武田賢治[1]，馬替純二[2]，片岡孝夫[1]（[1]京都工芸繊維大学応用生物，[2]馬替生科研）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**3C14p11　細胞接着因子の発現誘導と糖鎖修飾に対する五環性トリテルペノイドの作用機序の解析**
**16:50**　◦平松令子，馬場康輔，片岡孝夫（京都工繊大院・応生）

**3C14p12　Allantopyrone A binds or crosslinks TNF receptor 1 and inhibits TNF-α-induced signaling pathway**
**17:05**　◦Hue Tu QUACH[1]，Junpei YOKOIGAWA[1]，Yoshihito SHIONO[2]，Ken-ichi KIMURA[3]，Takao KATAOKA[1]（[1]Kyoto Institute of Technology, [2]Yamagata Univ., [3]Iwate Univ.）

**3C14p13　炎症性サイトカインによって誘導される細胞接着因子に対する kujigamberol の作用機序の解明**
**17:20**　◦福原早友里[1]，木村賢一[2]，片岡孝夫[1]（[1]京都工芸繊維大学・応生，[2]岩手大学・農）

**3C14p14　味噌特有のヒストン修飾制御活性成分の研究**
**17:35**　◦中村文彬，川村　緑，新井大祐，塩田邦夫郎，中尾洋一（早大理工）

**3C14p15　セリ科植物由来 GSK-3 β 阻害物質 falcarindiol の肝がん由来細胞における作用特性の解析**
**17:50**　◦吉田　潤[1]，木村賢一[2]（[1]岩手医大・教養教育セ・化学，[2]岩手大・農）

**3C14p16　キク科植物ヤーコン葉部の繊毛で生合成されるセスキテルペンラクトン類の昆虫摂食阻害活性**

**18:05** ○森本正則，松田一彦（近畿大農）

## C15 会場　午前の部（9:20〜12:00）

### 有機化学，天然物化学―医薬―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**3C15a01　海藻多糖によるアミロイド線維形成阻害**
**9:20** ○八木寿梓[1]，　木下竣貴[2]，　柏原直樹[3]，　川本仁志[4]，三木康成[4]，鈴木宏和[2]，大城　隆[2]（[1]鳥大・工・GSC，[2]鳥大院・工，[3]鳥大・工，[4]海産物のきむらや）

**3C15a02　アミロイド β による神経細胞毒性を抑制するプロアントシアニジン誘導体の開発**
**9:35** ○水野美麗[1]，　森　一憲[1]，　中西郁夫[2]，　松本謙一郎[2]，柴沼質子[1]，福原　潔[1]（[1]昭和大，[2]放医研）

**3C15a03　アルツハイマー病治療薬を目指したアミロイド β の C 末端ペプチドモチーフを有するフェノール性抗酸化剤の開発**
**9:50** ○福原　潔[1]，　荒井卓也[1,2]，　大野彰子[3]，　森　一憲[1]，柴沼質子[1]，宮田直樹[2]，中川秀彦[2]（[1]昭和大，[2]名市大，[3]国衛研）

**3C15a04　ハモ骨抽出物に含まれるヒト白血病 T 細胞株 Jurkat 細胞増殖抑制物質の探索**
**10:05** ○宮村知弥[1]，　祝　大知[2]，　宇高芳美[1]，　住慶太朗[3]，伊藤智広[4]，北山　隆[1,2]（[1]近畿大院・農・バイオ，[2]近畿大・農・バイオ，[3]近畿大院・農・水産，[4]三重大・院・生物資源）

**3C15a05　共役系保存型 zerumbone 誘導体を用いたヒト白血病 T 細胞株 Jurkat 細胞増殖抑制剤の開発**
**10:20** ○藤原裕子[1]，宇高芳美[2]，伊藤智広[3]，北山　隆[1,2]（[1]近畿大・農・バイオ，[2]近畿大院・農・バイオ，[3]三重大・院・生物資源）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**3C15a06　天然化合物由来の小胞体グルコシダーゼ II 阻害剤の構造展開とその誘導体の抗ウイルス活性**
**10:45** ○恩田桃子[1]，氏家　誠[3]，袴田　航[1,2]，平野貴子[1]，西尾俊幸[1,2]（[1]日大生資科・生命化，[2]日大院生資科，[3]日獣大獣医）

**3C15a07　*N*-結合型糖鎖修飾に関与する小胞体グルコシダーゼ II 阻害剤の合成と生物活性評価：抗ウイルス剤への応用を目指して**
**11:00** ○上間　駿[1]，朝日孝幸[2]，氏家　誠[3]，田代　充[4]，袴田　航[1,2]，平野貴子[2]，西尾俊幸[1,2]（[1]日大院生資科，[2]日大生資科，[3]日獣大獣医，[4]明星大理工）

**3C15a08　糸状菌代謝産物 ovalicin は赤痢アメーバ症肝膿瘍モデルハムスターに対して治療効果を示す**
**11:15** ○森美穂子[1,2]，　中野由美子[3]，　柘植聡志[1,2]，　大村　智[2]，塩見和朗[1,2]，野崎智義[3,4]（[1]北里大院感染制御，[2]北里生命研，[3]感染研，[4]筑波大院生命環境）

**3C15a09　抗がん剤への応用を目指した新規ゴルジ体マンノシダーゼ阻害剤の探索と評価**
**11:30** ○小山亮祐[1]，袴田　航[1,2]，平野貴子[2]，西尾俊幸[1,2]（[1]日大院生資化，[2]日大生資化・生命化）

**3C15a10　5,6-Dehydrokawain 誘導体の合成と破骨細胞分化抑制作用**
**11:45** ○熊谷百慶[1,2]，　西川慶祐[2]，　三嶋　隆[1]，　吉田　泉[1]，井出将博[1]，小泉慶子[1]，中村宗知[1]，森本善樹[2]（[1]日本食品分析センター，[2]大阪市大院理）

## C15 会場　午後の部（14:00〜18:20）

### 微生物―細胞－分離，分類，生態―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**3C15p01　京都独自の乳酸菌ライブラリーの構築と機能解析**
**14:00** ○和田　潤，泊　直宏，高阪千尋，清野珠美，廣岡青央，山本佳宏（京都市産技研）

**3C15p02　植物からの酵母の分離と食品への利用特性について**
**14:15** ○片山　海，成澤直規，森永　康，竹永章生（日大院・生資科）

**3C15p03　新奇ケルセチン代謝性腸内細菌 Bacterium N4-2 のヒト糞便からの分離**
**14:30** ○田村　基[1]，松尾洋輔[1]，中川博之[1]，寺尾純二[2]（[1]農研機構食品研究部門，[2]甲南女子大学）

**3C15p04　ヒト腸内からの新規微生物の分離とバイオリソース整備**
**14:45** ○坂本光央[1,2]，飯野隆夫[1]，大熊盛也[1]（[1]理研 BRC-JCM，[2]日本医療研究開発機構 , PRIME）

**3C15p05　超微小土壌細菌の単離および生化学的解析**
**15:00** ○堀内希恵[1]，山中　茂[2]，志田敏夫[1]（[1]信大院繊・応生，[2]信大）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**3C15p06　遺伝子検出法を用いた動物腸管由来運動性 *Lactobacillus* 属細菌の探索**
**15:25** ○藤田公紀[1]，横田健治[2]，五十君靜信[2]，梶川揚申[2]（[1]東農大院・農化，[2]東農大・生応化）

**3C15p07　循環型汚水浄化槽内の細菌叢遷移とアミノ酸代謝系の解析**
**15:40** ○日下みのり , 増子幸佑, 有見芳樹, 鈴木智順（東理大 応生）

**3C15p08　循環型汚水浄化槽における微生物叢変遷とタンパク質分解に関わる代謝系についての解析**
**15:55** ○増子幸佑，鈴木智順（東理大）

**3C15p09　循環型汚水浄化槽から選別した細菌株が有機物分解に与える影響**
**16:10** ○田中裕介，榊原健太，鈴木智順（東理大 応生）

**3C15p10　汚水浄化システムの細菌叢及び内部で活動する細菌の物質的依存関係の解析**
**16:25** ○島田紘帆，鈴木智順（東理大　応生）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**3C15p11　タイ由来のアルコール飲料用スターターにおける微生物叢の解析**
**16:50** ○北川哲也[1]，　米田英伸[1]，　高橋裕里香[1]，　西田洋巳[1]，H-Kittikun Aran[3]，Prasertsan Poonsuk[3]，浅野泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ，[2]JST,ERATO，[3]Prince of Songkla University）

**3C15p12　水田土壌より分離した新規電流生産菌 TKM1 株の性状解析**
**17:05** ○伴野佑介[1]，高見澤一裕[2]，中村浩平[2]（[1]岐阜大院応用生物，[2]岐阜大応用生物）

**3C15p13　*Sulfolobus metallicus* に関連した新規好熱好酸性アーキアの系統分類学的研究**
**17:20** ○三浦　樹[1,3]，　河井悦子[2,3]，　高品知典[1,2]，　伊藤　隆[3]，大熊盛也[3]（[1]東洋大院，生命科学，[2]東洋大 , 生命科学，[3]理研 BRC）

**3C15p14　MALDI-TOF MS を用いた放線菌の識別**
**17:35** ○高橋裕子[1]，　波多野和樹[1]，　五十嵐雅之[1]，　澤　竜一[1]，梅沢洋二[1]，加藤千明[2]（[1]微化研，[2]JAMSTEC）

**3C15p15　新しい系統に属する中温性クテドノバクテリアの分離と系統分類**
**17:50** ○矢部修平[1]，　酒井康輝[1]，　王　瓊渼[1]，　鄭　宇[1]，浜田盛之[2]，大塚重人[3]，阿部敬悦[1]，横田　明[1]（[1]東北大院・農，[2]NITE・NBRC，[3]東大院・農学生命）

**3C15p16　PCR-RFLP 法を用いた乳酸菌種のジェノタイピング**
**18:05** ○玉川英幸，伊藤良仁（(地独)岩手県工技セ）

## C17 会場　午前の部（9:20〜12:00）

### 微生物―細胞－情報伝達，細胞応答，ストレス応答―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**3C17a01　乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* 環境単離株における細胞外多糖層の合成量変化に伴うコロニー形態の相変異機構の解析**
**9:20** ○江橋由夏[1]，　河嶋伊都子[1]，　尾花　望[1]，　久保田浩美[2]，清川達則[1]，八城勢造[2]，永井　智[2]，野村暢彦[1]（[1]筑波大院・生命環境，[2]花王・安全性科学研）

**3C17a02　*Lactobacillus agilis* BKN88 における走化性の解析**

**9:35** ○近藤和穂[1]，横田健治[2]，五十君靜信[2]，梶川揚申[2]（[1]東農大院・農化，[2]東農大・生応化）

**3C17a03　*Methylobacterium* 属細菌におけるメタノール走化性センサーの同定**

**9:50** ○伊賀俊貴[1]，加藤純一[2]，谷　明生[1]（[1]岡山大植物研，[2]広島大院先端物質科学）

**3C17a04　*Paenibacillus* sp. の固形培地 に応答した鞭毛遺伝子の発現誘導**

**10:05** ○小林和夫（奈良先端大バイオ）

**3C17a05　枯草菌分子シャペロンによる変異緩衝作用の検証**

**10:20** ○北村夏美，法花津匠，大塚まみ，武井若紗，小菅是子，吉川博文（東京農大・院・バイオ専攻）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**3C17a06　枯草菌 RNAP コア酵素の変異による耐熱化と高温適応に対するトレードオフ**

**10:45** ○高松美沙樹[1]，兼崎　友[2]，朝井　計[3]，吉川博文[1,2]（[1]東京農大・院・バイオ専攻，[2]東京農大・ゲノム解析セ，[3]埼玉大・院・理工）

**3C17a07　耐熱性の減少を目的とした加圧処理による枯草菌芽胞の状態変化の解析**

**11:00** ○平澤貴昭，　中原健太，　小林裕紀，　中島加奈子，木戸みゆ紀，林真由美，野村一樹，井口晃徳，重松　亨（新潟薬大・応生科）

**3C17a08　*Paenibacillus* 属細菌のバイオフィルム形成は芽胞の性質に影響を与える**

**11:15** ○加藤寛子[1]，　横山佳奈[2]，　尾花　望[3]，　久保田浩美[2]，八城勢造[2]，永井　智[2]，野村暢彦[3]（[1]筑波大生物資源，[2]花王安全性科学研，[3]筑波大生命環境）

**3C17a09　*Paenibacillus alvei* No. 14 株の有する光反応機構のプロテオーム解析**

**11:30** ○末崎和弥[1]，吉原周佑[2]，村上周一郎[2]（[1]明治大院農・農化，[2]明治大農・農化）

**3C17a10　細胞毒素 Parasporin-1 受容体の探索**

**11:45** ○片山秀樹，日下芳友，奥村史朗，水城英一（福岡県 工技セ）

## C17 会場　午後の部（14:00〜18:20）

微生物―細胞－情報伝達，細胞応答，ストレス応答―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**3C17p01　ロドコッカス属細菌における凝集形態と NRPS の関係についての解析**

**14:00** ○茂木亮介[1]，　長田啓司[1]，　稲葉知大[2]，　尾花　望[3]，豊福雅典[3]，野村暢彦[3]（[1]筑波大院・生命環境，[2]産総研・環境管理，[3]筑波大・生命環境系）

**3C17p02　希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* のべん毛形成に必須なチオレドキシン AMIS75470 の機能部位および標的タンパク質の同定**

**14:15** ○木村知宏，手塚武揚，大西康夫（東大院・農生科）

**3C17p03　希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の胞子嚢形成に関与する AMIS76070 と相互作用するタンパク質の探索**

**14:30** ○小山達樹[1]，手塚武揚[2]，安久都卓哉[2]，大西康夫[2]（[1]東大農，[2]東大院・農生科）

**3C17p04　麹菌 *Aspergillus oryzae* の金属プロテアーゼ insulysin の機能解析**

**14:45** ○鈴木遥香，吉永良平，竹内道雄，山形洋平（農工大農）

**3C17p05　酵母凝集反応を利用した新規エピジェネティック変異原検出法の開発**

**15:00** ○杉山圭一，　古沢博子，　グルーズピーター，　本間正充（国立衛研・変異遺伝部）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**3C17p06　新規 in vitro assay 系を用いた Gtr 非依存的 TORC1 活性化経路の解析**

**15:25** ○谷川美頼，前田達哉（東大・分生研）

**3C17p07　菌類遺伝子プロモーターにおけるヌクレオソーム位置のエピジェネティクス**

**15:40** ○中宮ひかる，居島冴香，西田洋巳（富山県大）

**3C17p08　出芽酵母の栄養応答に関わる新規細胞表層タンパク質の同定**

**15:55** ○梅川碧里，氏原将人，中井大貴，若山　守（立命生命）

**3C17p09　出芽酵母のストレス応答に関わる 4 つの新規陽イオンチャネルの機能解析**

**16:10** ○上原千央，星　直美，浜本　晋，魚住信之（東北大・院工・バイオ工学）

**3C17p10　酵母膜ドメイン・エイソソームの構造・機能に関わる遺伝子群の解析**

**16:25** ○橋井圭介[1]，　田原悠平[2]，　宮田真人[2]，　八重佳織[1]，田中直孝[1]，田淵光昭[1]（[1]香川大農，[2]大阪市大）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**3C17p11　RNA 結合タンパク質 Byr3 は分裂酵母 Rad26 変異株のチェックポイント機能欠損を相補する**

**16:50** ○脇田健史[1]，井倉　毅[1]，古谷寛治[2]（[1]京大，放生研，突然変異，[2]京大，放生研，放射線システム）

**3C17p12　メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を用いたメタノールセンサー細胞の開発**

**17:05** ○竹谷友之，由里本博也，阪井康能（京大院農・応用生命）

**3C17p13　酵母に見出したフラボタンパク質 Tah18 依存的な一酸化窒素の合成制御機構と生理機能解析**

**17:20** ○吉川雄樹，那須野亮，渡辺大輔，高木博史（奈良先端大）

**3C17p14　出芽酵母プロテインキナーゼ C のリン酸化における Pkh1/Pkh2 と TORC2 の相関性**

**17:35** ○今井杏理紗[1]，野村　亘[2]，井上善晴[1]（[1]京大院・農・応生科，[2]京大院・農・食品生物）

**3C17p15　出芽酵母における TORC2-Pkc1 シグナル経路の活性化に関与する因子の探索**

**17:50** ○富本千晶[1]，　伊藤有亮[1]，　池田佳代[1]，　野村　亘[2]，井上善晴[1]（[1]京大院・農・応生科，[2]京大院・農・食品生物）

**3C17p16　TOR 複合体 2 シグナル経路の活性化における Cdc42 の役割**

**18:05** ○野村　亘[1,5]，　後藤　剛[1,5]，　高原照直[2]，　前田達哉[3]，河田照雄[1,5]，井上善晴[4]（[1]京大院・農・食品生物，[2]名大院・生命農・応用分子生命科学，[3]東大・分生研，[4]京大院・農・応生科，[5]京大・生理化学研究ユニット）

## C18 会場　午前の部（9:20〜12:00）

微生物―遺伝子－構造，機能―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**3C18a01　タイプ A トリコテセン生産菌の経路酵素遺伝子変異株の解析**

**9:20** ○田中佑弥[1]，　杉浦涼介[1]，　田中　彰[2]，　前田一行[1]，松井宏介[2]，　中嶋佑一[1]，　金丸京子[1]，　小林哲夫[1]，　安藤直子[2]，木村　真[1]（[1]名大農・生命農学，[2]東洋大工研・理工研）

**3C18a02　ダイズと *Bradyrhizobium diazoefficiens* との共生不和合性を誘導する 根粒菌 3 型分泌エフェクター**

**9:35** ○菅原雅之[1]，　岩野裕也[1]，　今道　仁[1]，　高橋智子[1]，佐藤修正[1]，梅原洋佐[2]，三井久幸[1]，南澤　究[1]（[1]東北大生命，[2]農研機構）

**3C18a03　複製遺伝子 *repABC* を二つ具備する Ti プラスミドの各 *repABC* 領域の機能**

**9:50** ○山本真司，ビタアグスティーナ，坂井綾子，守口和基，鈴木克周（広大理）

**3C18a04　ランダム変異による *Thermococcus kodakarensis* 高温感受性株の単離と解析**

**10:05** ○金子　瑛[1]，二石涼平[1]，折田和泉[1]，中村　聡[1]，今中忠行[2]，福居俊昭[1]（[1]東工大生命理工学院，[2]立命館大生命科学）

**3C18a05　Complex formation and DNA-binding properties of probable regulatory proteins for chitin-assimilation genes in Thermococcus kodakarensis**

**10:20**　°Junqi Yan[1], Yoshinari Nomura[1], Izumi Orita[1], Satoshi Nakamura[1], Tadayuki Imanaka[2], Toshiaki Fukui[1]（[1]Sch. Life Sci. & Technol, Tokyo Tech., [2]Coll.Life Sci.,Ritsumeikan Univ.）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**3C18a06　高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の *supF* 変異検出系の構築**

**10:45**　°外川陽一郎[1]，塩谷詩織[1]，布柴達男[2]，平津圭一郎[3]（[1]防衛大・理工研・応化，[2]国基大，[3]防衛大・応化）

**3C18a07　Thermus thermophilus HB27 における VapBC Toxin-Antotxin System の機能解析**

**11:00**　°Fan Yuqi，星野貴行，中村　顕（筑波大）

**3C18a08　Mrp アンチポーターにおけるイオン選択性と輸送サブユニットの同定**

**11:15**　°松井光恵，伊藤政博（東洋大院 生命科学）

**3C18a09　$Na^+$と $K^+$を共役イオンとして回転するハイブリッド型べん毛モーター固定子のイオン選択機構の解明**

**11:30**　°長縄　俊，今澤　陸，伊藤政博（東洋大院 生命科学）

**3C18a10　*Microbacterium* sp. TS-1 の $Cs^+$排出機構に関わるアンチポーターの同定**

**11:45**　°金田悠里，伊藤政博（東洋大学 生命科学）

## C18 会場　午後の部（14:00〜18:20）

微生物―遺伝子ー構造，機能―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**3C18p01　*Lactobacillus paracasei* EG9 株におけるプラスミド喪失と生育特性への影響**

**14:00**　°朝比奈唯[1,2]，萩　達朗[2]，田島淳史[1]，城間安紀乃[3]，保日奈子[3]，安次嶺典子[3]，下地真紀子[3]，新里美寿々[3]，南茉緯子[3]，中野和真[3]，大木　駿[3]，中西哲大[3]，照屋邦子[3]，佐藤万仁[3]，平野　隆[3]，鈴木チセ[2]，守谷直子[2]，小林美穂[2]，野村　将[2]（[1]筑波大院・生命環境，[2]農研機構畜産研，[3](一社)沖縄綜研）

**3C18p02　消化管における生存と定着に寄与するビフィズス菌遺伝子の探索系の構築**

**14:15**　中川路伸吾[1]，中島　森[1]，阪中幹祥[2]，小椋義俊[3]，林　哲也[3]，横田　篤[1]，°吹谷　智[1]（[1]北大農，[2]石川県大，[3]九大医）

**3C18p03　*Lactobacillus casei* が有する免疫誘導分子の探索系の構築**

**14:30**　°関根　侑[1]，野口実莉[2]，石浜　峻[1]，桝田和彌[1,3]，梶川揚申[2]，横田健治[2]，五十君靜信[2]（[1]東農大院・農化，[2]東農大・生応科，[3]国立医薬品食品衛生研究所）

**3C18p04　Elucidation of the roles of sirtuin in *Lactobacillus paracasei***

**14:45**　°Glaezel Angelique Torres[1], Aiko Hirata[2], Akinobu Kajikawa[3], Shinji Kawasaki[4], Akihito Endo[1], Junichi Nakagawa[1]（[1]Graduate School of Bioindustry, Tokyo University of Agriculture, [2]Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, [3]Department of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture, [4]Department of Bioscience, Tokyo University of Agriculture）

**3C18p05　*Bifidobacterium bifidum* におけるシアリダーゼは宿主との相互作用を促進し糖の資化をサポートする**

**15:00**　°西山啓太[1]，山本裕司[2]，杉山真言[2]，篠原有香[2]，浦島　匡[3]，吹谷　智[4]，横田　篤[4]，岡田信彦[1]，向井孝夫[2]（[1]北里大・薬，[2]北里大・獣医，[3]帯広畜産大・畜産衛生，[4]北大院・農）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**3C18p06　*Paenibacillus sp.* FPU-37 株における 180-kDa 糖タンパク質遺伝子のクローニングと発現**

**15:25**　°吉見僚太[1]，藤井　豊[2]，田端和仁[3]，野地博行[3]，木元　久[1]（[1]福井県大院・生物資源，[2]福井大・医，[3]東大院・工）

**3C18p07　枯草菌糖脂質合成酵素遺伝子 *ugtP* の発現制御解析**

**15:40**　°松岡　聡，竹本愛奈，関　貴洋，松本幸次，朝井　計，原　弘志（埼玉大理工研）

**3C18p08　*rsiV* 変異株における枯草菌ファージ $\phi$ 29 の増殖阻害**

**15:55**　°木寺夏穂[1]，小田嶋拓也[1]，刀禰高広[1]，竹内　有[1]，兼崎　友[2]，吉川博文[3]，朝井　計[4]，牧野　修[1]（[1]上智大・理工，[2]東農大・NGRC，[3]東農大・バイオ，[4]埼玉大・理工学研究科・分子生物学）

**3C18p09　枯草菌 $F_oF_1$ ATP 合成酵素活性調節の生理的意義の解明**

**16:10**　°赤沼元気[1]，澤田真帆[1]，多賀名智明[1]，島田友裕[2]，田中　寛[2]，大坂夏木[3]，吉川博文[3]，河村富士夫[1]，山田康之[1]（[1]立教大・理，[2]東工大・科学技術，[3]東農大・応生科）

**3C18p10　$Mg^{2+}$ による多様なリボソームタンパク質機能の相補**

**16:25**　°山崎晃太朗，赤沼元気，矢岸勇真，河村富士夫，山田康之（立教大理）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**3C18p11　大腸菌は L-アラニン排出輸送体 AlaE と新規排出輸送体 YtfF によって L-アラニンを排出する**

**16:50**　°勝部　哲，金　世怜，齊藤康平，安藤太助，磯貝恵美子，米山　裕（東北大農）

**3C18p12　大腸菌の L-アラニン排出輸送体 AlaE の構造と機能解析**

**17:05**　°伊原航平，金　世怜，安藤太助，磯貝恵美子，米山　裕（東北大院農）

**3C18p13　*Sphingobium* sp. TCM1 株における有機リン難燃剤分解代謝に関与するアルカリホスファターゼ遺伝子の同定**

**17:20**　°高橋祥司，片沼拓士，阿部勝正，解良芳夫（長岡技科大・生物）

**3C18p14　放線菌 *Streptomyces griseus* において形態分化に関与する遺伝子 *SGR3428* の機能解析**

**17:35**　°戚　思聡，手塚武揚，大西康夫（東大院・農生科）

**3C18p15　ビフェニル資化性ゲノミックアイランド ICEbph の切り出し制御の分子機構の解析**

**17:50**　°荻野千紘，前田理久（明治大学大学院農学研究科）

**3C18p16　グラム陰性細菌 *Paracoccus denitrificans* の付着因子の解析**

**18:05**　°吉田圭太朗，豊福雅典，尾花　望，野村暢彦（筑波大院・生命環境）

## C19 会場　午前の部（9:20〜12:00）

微生物―細胞ー複合微生物，共生微生物，難培養性微生物―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**3C19a01　固体表面への付着現象を利用した環境微生物の分離技術の開発**

**9:20**　°羽鳥伸太郎，大西章博，藤本尚志，鈴木昌治（東農大）

**3C19a02　共培養法による環境試料からのセルロース分解菌の集積**

**9:35**　°北村俊貴，大西章博，藤本尚志，鈴木昌治（東農大）

**3C19a03　Construction of a microbial co-culture useful for ammonification and nitrification**

**9:50**　°Sakuntala SAIJAI[1], Akinori ANDO[1,2], Wakako OKADA[1], Kenji MIYAMOTO[3], Yasuo KATO[4], Makoto SHINOHARA[5], Jun OGAWA[1,2]（[1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Res. Unit Physiol. Chem. Kyoto Univ., [3]Dept. Biosci. Inform., Keio Univ., [4]Biotech. Res. Cent., Toyama Pref., [5]NARO）

**3C19a04　必要最小限の土壌微生物（エレメンタル土壌微生物）の有機物耐性**

**10:05**　°篠原　信[1]，高田惟名[2]，河邑ちひろ[1]，藤原和樹[1]，安藤晃規[3]，宮本憲二[4]，加藤康夫[5]，小川　順[3]，高野雅夫[2]（[1]農研機構，[2]名大院・環境，[3]京大院農・応用生命，[4]慶大・理工，[5]富山県立大工）

**3C19a05　難分解性有機塩素系殺虫剤の分解細菌コミュニティにおける非分解菌の役割**

**10:20** ○加藤広海, 大坪嘉行, 津田雅孝, 永田裕二（東北大院生命）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**3C19a06　フェナントレン分解細菌の生育阻害緩和に対する非分解細菌の生細胞の重要性**
**10:45** ○小川なつみ，加藤広海，大坪嘉行，永田裕二，津田雅孝（東北大院生命科学）

**3C19a07　細菌集団におけるプラスミドの受容菌選り好み機構の発見と解析**
**11:00** ○作田郁子[1]，水口千穂[1]，小曽根郁子[2]，橋本絢子[2]，小松　護[3]，新家一男[4]，池田治生[3]，森内良太[5]，道羅英夫[5]，新谷政己[6]，岡田憲典[1]，野尻秀昭[1]（[1]東大生物工学セ，[2]JBIC，[3]北里大・北里生命研，[4]産総研，[5]静大・グリーン研，[6]静大院・工）

**3C19a08　難培養放線菌 *Leucobacter* sp.212 株の Zn coproporphyrin 類による増殖機構の探索**
**11:15** ○高井亮吾，モハンマドナズルールイスラムブイヤン，重冨顕吾，鎌形洋一，生方　信（北大院農）

**3C19a09　プロピオン酸酸化細菌のプロピオン酸酸化からの水素生成に関与する因子の探索**
**11:30** ○高坂智之[1,2]，津島由佳[1]，石口貴之[3]，山田　守[1,2]（[1]山口大院・創科，[2]山口大中高温微生物セ，[3]山口大院・農）

**3C19a10　*Methylobacterium* sp. ME121 株の運動性向上を引き起こす因子の同定**
**11:45** ○薄井祥明[1]，若林　佑[2]，清水　哲[3]，中村　顕[3]，伊藤政博[1,2]（[1]東洋大・生命科，[2]東洋大院・生命科学，[3]筑波大・生命環境系）

## C19 会場　午後の部（14:00〜18:20）

微生物―細胞－栄養，生育，増殖―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**3C19p01　疎水性樹脂ネットによるカビ胞子の生産性の向上**
**14:00** ○小田　忍，城戸良介，大箸信一（金沢工大ゲノム研）

**3C19p02　固体及び細胞の表面疎水性とバイオフィルム形成量の関係解明**
**14:15** ○谷川絢美[1]，小田　忍[2]，大箸信一[2]（[1]金沢工大大学院，[2]金沢工大ゲノム研）

**3C19p03　異なる表面構造上におけるバイオフィルム形成機構の解析**
**14:30** ○宮崎　俊，清川達則，尾花　望，別役重之，UTADA A. S，野村暢彦（筑波大・生命環境）

**3C19p04　非生物素材に付着した大腸菌 O157 のバイオフィルム形成**
**14:45** ○横井川久己男[1]，高橋啓子[2]，金丸　芳[1]（[1]徳島大院・生物資源，[2]徳島大院・総合科学）

**3C19p05　乳酸酸性下における乳酸菌と酵母の共凝集現象の解析**
**15:00** ○近藤陽香，平井智美，川澄俊之（日女大家政）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**3C19p06　分裂酵母 *ura4* 破壊株の細胞溶解に関連する培地成分の解析**
**15:25** ○西野耕平，櫛間満咲，松尾安浩，川向　誠（島根大・生物資源科学・生命工）

**3C19p07　分裂酵母でリン脂質ホスファチジルセリンあるいはホスファチジルエタノールアミンの欠損は，硫化水素の発生を引き起こす**
**15:40** ○松尾安浩，川向　誠（島根大・生物資源・生命工）

**3C19p08　酵母の活性型 Pkc1 の過剰発現による細胞死とキチン合成酵素の局在変化**
**15:55** ○福井健人[1]，野村　亘[2]，井上善晴[1]（[1]京大院・農・応生科，[2]京大院・農・食品生物）

**3C19p09　出芽酵母の *S*-アデノシルメチオニン合成が関与する寿命制御機構の解析**
**16:10** ○小川貴史[1]，椿山諒平[1]，金井宗良[2]，藤井　力[2]，平田　大[3]，水沼正樹[1]（[1]広島大院・先端研，[2]酒総研，[3]朝日酒造・研究開発）

**3C19p10　出芽酵母の *S*-アデノシルメチオニントランスポーター *SAM3* が関与する寿命制御機構の解析**
**16:25** ○種谷麻由佳，小川貴史，久米一規，水沼正樹　（広島大院・先端研）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**3C19p11　オリゴペプチド輸送体の基質特異性**
**16:50** ○北村憲司（広島大自然科学研セ）

**3C19p12　酵母 *Kluyveromyces marxianus* のラクトース資化能を向上させるトランスポーター遺伝子の同定**
**17:05** ○廣田潤哉，星田尚司，赤田倫治　（山口大院創成科学化学系）

**3C19p13　細胞が環境グルコース濃度を認識し，グルコース輸送体の発現を調節する分子機構の解明**
**17:20** ○寺田祐子，齋藤成昭（久留米大 分生研）

**3C19p14　酵母トリプトファン輸送体 Tat1 の分解における細胞質末端リン酸化の関与**
**17:35** ○望月貴博，小幡咲希子，阿部文快（青山学院大理工）

**3C19p15　Rsp5-Bul1 複合体を介した酵母トリプトファン輸送体 Tat2 の分解**
**17:50** ○石井凌賀[1]，天野香織[1]，荒牧真理[1]，野際佳奈[1]，上村聡志[2]，望月貴博[1]，阿部文快[1]（[1]青山学院大理工，[2]東北医科薬科医学）

**3C19p16　出芽酵母の高圧増殖における SOD1 の役割**
**18:05** ○三ヶ尻祐，阿部文快（青山学院大理工）

## C20 会場　午前の部（9:20〜12:00）

微生物―その他―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**3C20a01　二形性真菌 *Mucor circinelloides* の形態変化による表現型スクリーニングの応用**
**9:20** ○岩倉　遼，高野真希，星野一宏（富山大院理工）

**3C20a02　*Streptomyces* 属放線菌における自然突然変異の発生と二次代謝を変調させる 23S rRNA 遺伝子変異の特性解析**
**9:35** ○星野　颯[1]，今井　優[1,2]，濵渦亮子[3]，越智幸三[4]，保坂　毅[3]（[1]信大農，[2]ノースイースタン大，[3]信大先鋭領域融合研究群，[4]広工大生命）

**3C20a03　接合伝達プラスミド pAM $\beta$ 1 を用いた *Lactobacillus delbrueckii* 5 亜種の遺伝子操作法の検討**
**9:50** ○石崎　萌，岩本大輝，佐々木泰子（明治大農）

**3C20a04　ガラスビーズ法を応用したスラウストキトリッド類微生物への遺伝子導入**
**10:05** ○足立　匠[1,2]，佐原健彦[2]，森田直樹[1,2]（[1]北大院農・基礎環境微生物学，[2]産総研・生物プロセス）

**3C20a05　ゲノム合成を意識した溶菌法（CELyTED）の活用**
**10:20** ○金子真也[1]，中濱みさ子[1]，板谷光泰[2]（[1]東工大・生命理工，[2]慶應大・先端生命研）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**3C20a06　放線菌 *S. coelicolor* A3(2) の分泌タンパク質と二次代謝産物アクチノロージンとの菌体外相互作用の解析**
**10:45** ○西山辰也[1]，橋本義輝[2]，高野英晃[1]，上田賢志[1]，小林達彦[2]（[1]日大生資科・生命セ，[2]筑波大院・生命環境）

**3C20a07　麹菌アルギニントランスポータの解析**
**11:00** ○佐野元昭，内田麻瑚，中谷貴人，松岡晃史（金沢工大）

**3C20a08　IL-1 ファミリーサイトカイン分泌乳酸菌の構築と評価**
**11:15** ○辻　光倭[1]，鈴木駿也[1]，横田健治[2]，五十君靜信[2]，梶川揚申[2]（[1]東農大院・農化，[2]東農大・生応科）

**3C20a09　酢酸菌の免疫刺激作用に関与する菌体構成成分の探索**
**11:30** ○五日市悠[1]，柴崎泰基[2]，横田健治[2]，五十君靜信[2]，梶川揚申[2]（[1]東農大院・農化，[2]東農大・生応科）

**3C20a10　細菌べん毛モーターの新規阻害剤の探索**

**11:45** ○高橋優嘉[1]，伊藤政博[1,2]（[1]東洋大･バイオ，[2]東洋大･生命）

## C20 会場　午後の部（14:00〜17:50）

微生物―細胞－構造，オルガネラ，小胞，分泌，細胞構成分子―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**3C20p01　脂肪滴膜リン脂質の脂肪酸不飽和度が脂肪滴膜タンパク質の局在移行に与える影響**
**14:00** ○有澤琴子[1]，市　育代[2,3]，藤原葉子[2,3]（[1]お茶大院・ライフ，[2]お茶大・基幹研究院，[3]お茶大・HLI 研）

**3C20p02　新規紡錘体形成経路の探索**
**14:15** ○湯川格史[1,2]，岡崎雅紀[1]，登田　隆[1,2]（[1]広島大・院先端研・分子生命，[2]広島大・健康長寿）

**3C20p03　液胞膜タンパク質の分解に必要なユビキチン化反応**
**14:30** ○中川沙良，奥　公秀，阪井康能（京大院農）

**3C20p04　$Ca^{2+}$流入の変動により制御されるアクチンの重合・エキソサイトーシス・菌糸の先端生長**
**14:45** ○竹下典男[1,2]，Minoas Evangelinos[2]，Ling Lu[3]，Reinhard Fischer[2]（[1]筑波大生命環境，[2]カールスルーエ工科大，[3]南京師範大学）

**3C20p05　黄麹菌 *Aspergillus oryzae* において初期エンドソーム動態は細胞の分化制御およびタンパク質分泌に関与する**
**15:00** ○樋口裕次郎，都甲祐介，竹川　薫（九大農）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**3C20p06　黄麹菌のハイドロフォービン HypC の機能解析**
**15:25** ○廣木寛之，石倉幹大，朽方康裕，中野宏軌，中島春紫（明治大農）

**3C20p07　黄麹菌 *Aspergillus oryzae* ハイドロフォービン群の吸着性に関する物性解析**
**15:40** ○加瀬明日香，中野宏軌，廣木寛之，中島春紫（明治大農）

**3C20p08　ニコチンアミドによるユーグレナの鞭毛の特異的離脱反応の解析**
**15:55** ○中野長久[1]，大桑(林)浩孝[1]，乾　博[2]，阪本龍司[3]（[1]大阪府立大学地域連携研究機構 生物資源開発センター，[2]大阪府立大学大学院総合リハビリテーション学研究科，[3]大阪府立大学大学院生命環境科学研究科）

**3C20p09　腸球菌ナトリウム輸送性 V-ATPase 膜内在性サブユニットの変異体解析**
**16:10** ○山地有紀奈[1]，丸橋優那[1]，大江怜奈[1]，西谷幸大[1]，関藤孝之[1]，河田美幸[1,2]（[1]愛媛大農，[2]愛媛大学術支援セ）

**3C20p10　乳酸菌由来 S-layer タンパク質の免疫学的特性**
**16:25** ○鈴木駿也[1]，横田健治[2]，五十君靜信[2]，梶川揚申[2]（[1]東農大院・農化，[2]東農大・生応科）

**p11〜p14 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**3C20p11　Localization of 30S ribosomal protein S19 on the cell surface of *Lactobacillus rhamnosus* strains FSMM15 and FSMM22**
**16:50** ○Niputudesy Aryantini[1]，Daisuke Kondoh[1]，Keita Nishiyama[2]，Yuji Yamamoto[2]，Takao Mukai[2]，INengah Sujaya[3]，Tadasu Urashima[1]，Kenji Fukuda[1]（[1]Obihiro Univ.，[2]Kitasato Univ.，[3]Udayana Univ.）

**3C20p12　大腸菌のペリプラズムプロテアーゼ BepA は，TPR domain を介したタンパク質間相互作用により外膜機能を維持する**
**17:05** ○大門康志[1]，舛井千草[1]，宮﨑亮次[1]，櫻田洋人[2]，田中良樹[2]，鈴木健裕[3]，堂前　直[3]，森　博幸[1]，塚崎智也[2]，成田新一郎[4]，秋山芳展[1]（[1]京大ウイルス・再生研，[2]奈良先端大・バイオサイエンス，[3]理研・生命分子解析，[4]盛岡大・栄養科学）

**3C20p13　複数のイオンを利用するべん毛モーター固定子 MotS の最小機能領**
**17:20** ○山本まみ，田口温子，伊藤政博（東洋大院生命科学）

**3C20p14　シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 外膜の有機炭素及び無機イオン透過性の解析**
**17:35** ○木幡　光[1]，栃木佐枝子[2]，高橋秀幸[1]，児島征司[1,2]（[1]東北大院・生命，[2]東北大・学際研）

## C23 会場　午前の部（9:20〜12:00）

微生物―物質生産－醸造，発酵(一次代謝産物)―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**3C23a01　分泌性グルコアミラーゼ *STA1* 発現ビール酵母の接合育種**
**9:20** ○川田貴世，岩下祐子，尾形智夫（前橋工科大学）

**3C23a02　圧力感受性ミトコンドリア供与による圧力感受性清酒酵母株の作出**
**9:35** ○野村一樹，　星野浩史，　田中絵莉果，　中島加奈子，林真由美，井口晃徳，重松　亨（新潟薬大・応生科）

**3C23a03　協会系酵母とは系統が異なる清酒酵母のストレス応答とアルコール発酵能**
**9:50** ○高尾佳史[1]，　山田　翼[1]，　五島徹也[2]，　冨本和也[2]，赤尾　健[2]，末野和男[1]（[1]菊正宗・総研，[2]酒類総研）

**3C23a04　実験室酵母変異株を用いたストレス感受性と清酒発酵力との関係の解析**
**10:05** ○前田岳彦，山田美和，下飯　仁（岩手大農）

**3C23a05　清酒酵母によるガラクトース代謝能の解析**
**10:20** ○小松原芙未[1]，　池永　裕[1]，　佐藤勝也[2]，　鳴海一成[3]，渡部貴志[4]，増渕　隆[4]，林　秀謙[1]（[1]前工大院工，[2]量研機構，[3]東洋大生命，[4]群技セ）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**3C23a06　清酒酵母きょうかい 7 号から得られた一倍体では染色体組換えが生じていない**
**10:45** ○花角優太[1]，　清水頌平[2,3]，　鈴木太郎[2,3]，　赤尾　健[3]，山田美和[1]，下飯　仁[1,2,3]（[1]岩手大・農，[2]広島大院・先端研，[3]酒総研）

**3C23a07　老香前駆物質を生成しにくい清酒酵母の育種**
**11:00** ○若林　興[1]，　井上豊久[1]，　池田優理子[2]，　神田涼子[2]，磯谷敦子[2]，藤井　力[2]，中江貴司[1]（[1]日本盛，[2]酒総研）

**3C23a08　セルフクローニング法による清酒酵母の老香関連遺伝子 *MRI1* 変異株の作製**
**11:15** ○宇原　諒[1,2]，　池田優理子[2]，　若林　興[3]，　井上豊久[3]，中江貴司[3]，磯谷敦子[2]，藤井　力[1,2]（[1]広島大院・生物圏，[2]酒総研，[3]日本盛）

**3C23a09　セルフクローニング法による清酒酵母の老香関連遺伝子 *MRI1* 完全欠失株の作製**
**11:30** ○池田優理子[1]，　森吉雄太[1,2]，　神田涼子[1]，　磯谷敦子[1,2]，藤井　力[1]（[1]酒総研，[2]広島大院・先端研）

**3C23a10　清酒酵母の自然染色体部分倍加による代謝制御**
**11:45** ○門脇真史[1]，　田口誠我[1]，　澤田和敬[2]，　浜島弘史[1]，赤尾　健[3]，野口英樹[4]，豊田　敦[4]，藤山秋佐夫[4,5]，北垣浩志[1]（[1]佐大農，[2]佐賀工技セ，[3]酒総研，[4]遺伝研，[5]総研大･遺伝学専攻）

## C23 会場　午後の部（14:00〜18:20）

微生物―物質生産－醸造，発酵(一次代謝産物)―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**3C23p01　キレの良いビールを造る下面発酵酵母の高発酵力とその遺伝子解析**
**14:00** ○大室　繭，本山靖朗，渡邊哲也（アサヒビール株式会社）

**3C23p02　泡盛酵母の NaCl 耐性に関わる遺伝子の探索**
**14:15** ○吉田嵩策，外山博英（琉大農・亜熱生資）

**3C23p03　清酒の呈味性ピログルタミルデカペプチドエチルエステル(PGDPEs)の同位体希釈分析法(SIDA)による定量と閾値**
**14:30** ○橋爪克己，五十嵐信也，高橋　樹，伊藤俊彦（秋田県大）

**3C23p04　麹グルコシルセラミドが酵母の代謝特性に及ぼす生理**

的役割に関する研究
**14:45** ○上田真利奈[1]，中畑絵里子[1]，澤田和敬[2]，浜島弘史[1]，髙峯和則[3]，北垣浩志[1]（[1]佐大農，[2]佐賀工技セ，[3]鹿大農）

**3C23p05　協会酵母と花から分離した野生酵母とのイソマルトース資化性の違いが清酒の味に与える影響**
**15:00** ○大原礼仁[1]，望月麻衣[1]，船越吾郎[2]，三井　俊[2]，伊藤彰敏[2]，志水元亨[1]，加藤雅士[1]（[1]名城大農，[2]あいち産業技術セ・食品工業技術セ）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**3C23p06　高度精白米の品質向上のための精米プログラムに関する研究**
**15:25** ○中村　諒[1,2]，市川絵梨[1]，廣川豊和[1]，宮内英昭[1]，田村博康[1]，佐藤謙仁[1]，安澤義彦[1]，平田　大[1,2]（[1]朝日酒造㈱，[2]広大院　先端研）

**3C23p07　製麹条件の違いによる品温経過と酵素生産への影響**
**15:40** ○谷野有佳[1]，伊藤一成[1]，五味勝也[2]，狩山昌弘[3]，三宅剛史[1]（[1]岡山県工技セ，[2]東北大院農・生物産業創成，[3]株式会社フジワラテクノアート）

**3C23p08　米麹の破精の観察とその評価法の確立**
**15:55** ○伊藤一成[1]，谷野有佳[1]，五味勝也[2]，狩山昌弘[3]，三宅剛史[1]（[1]岡山県工技セ，[2]東北大院農・生物産業創成，[3]株式会社フジワラテクノアート）

**3C23p09　酒造好適米・越淡麗に適した種もやしの探索**
**16:10** ○市川絵梨[1]，安澤義彦[1]，中村　諒[1,2]，田村博康[1]，金桶光起[3]，岩下和裕[4]，平田　大[1,2]（[1]朝日酒造㈱，[2]広大院・先端研，[3]新潟醸試，[4]酒総研）

**3C23p10　モロミックス解析による清酒中のアルギニン・アグマチンの生産性に関連する遺伝子の同定**
**16:25** ○岩下和裕[1]，嶋本孝平[2]，河内護之[3]，織田　健[1]（[1]酒類研，[2]広島大院・生物圏，[3]東大農）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**3C23p11　ポジティブセレクションが出来ない遺伝子の麹菌ゲノム編集法の開発**
**16:50** ○嶋本孝平[1,2]，齋藤亮太[1]，和田悠作[3]，織田　健[1]，奥田将生[1,2]，岩下和裕[1]（[1]酒類総合研究所，[2]広島大院・生物圏，[3]㈱ファスマック）

**3C23p12　麹菌 *Aspergillus oryzae* の多重代謝改変による遊離脂肪酸の生産性向上**
**17:05** ○玉野孝一，小池英明，三浦　愛（産総研･生物プロセス）

**3C23p13　日本の伝統発酵食品に含まれている麹グリコシルセラミド含量の解析**
**17:20** ○北垣浩志[1]，酒谷真以[1]，Ferdouse Jannatul[1]，阪本真由子[1]，浜島浩史[1]，柘植圭介[2]，西向めぐみ[4]，柳田晃良[3]，永尾晃治[1]，光武　進[1]（[1]佐賀大学，[2]佐賀県工業技術センター，[3]西九州大学，[4]岩手大学）

**3C23p14　麹グリコシルセラミドによる腸内細菌叢への影響解析**
**17:35** ○佐藤友哉[1]，加藤暖菜[1]，浜島弘史[1]，中山二郎[2]，北垣浩志[1]（[1]佐大農，[2]九大農）

**3C23p15　白麹菌における推定クエン酸輸送体 YhmA と CtpA の機能解析**
**17:50** ○門岡千尋[1]，泉津弘佑[2]，奥津果優[1]，吉﨑由美子[1]，髙峯和則[1]，後藤正利[3]，玉置尚徳[1]，二神泰基[1]（[1]鹿大農，[2]滋賀県大，[3]佐賀大農）

**3C23p16　*Aspergillus luchuensis* によるフェルラ酸脱炭酸反応**
**18:05** ○眞榮田麻友美[1]，渡嘉敷正司[2]，渡嘉敷みどり[2]，後藤正利[3]，伊藤　進[1]，平良東紀[1]（[1]琉球大農，[2]石川種麹店，[3]佐賀大農）

## C24 会場　午前の部（9:20〜12:00）

微生物―代謝－代謝調節，発酵生理，メタボローム―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**3C24a01　キノール酸化酵素の欠失が *Corynebacterium glutamicum* のグルタミン酸生産に与える影響**
**9:20** ○片岡尚也[1,2,3]，那須裕介[2]，藥師寿治[1,2,3]，和田　大[4]，横田　篤[4]，松下一信[1,2,3]（[1]山口大院創成科学，[2]山口大農，[3]山口大中高温微生物セ，[4]北大院農）

**3C24a02　酢酸菌 *Gluconobacter thailandicus* におけるジヒドロキシアセトン・リン酸化酵素の遺伝学的・生化学的解析**
**9:35** ○藥師寿治[1,2,3]，平田花織[1]，松谷峰之介[2]，足立収生[1,2]，片岡尚也[1,2,3]，松下一信[1,2,3]（[1]山口大・農，[2]山口大・院創科，[3]山口大・微研セ）

**3C24a03　*Gluconobacter* 属酢酸菌キノプロテイン・グリセロール脱水素酵素における新たな基質の発見とその反応メカニズムの提唱**
**9:50** ○寺田優花[1]，尾崎聖士朗[2]，片岡尚也[1,2,3]，足立収生[1,2]，赤壁善彦[1,2]，藥師寿治[1,2,3]，松下一信[1,2,3]（[1]山口大・院創科，[2]山口大・農，[3]山口大・微研セ）

**3C24a04　*Gluconobacter frateurii* CHM43 高温適応育種株の耐熱化機構の解析**
**10:05** ○松本奈実[1]，服部浩美[1]，松谷峰之介[1]，外山博英[2]，片岡尚也[1,3]，藥師寿治[1,3]，松下一信[1,3]（[1]山口大院創成科学，[2]琉球大院農，[3]山口大中高温微セ）

**3C24a05　プロリン蓄積によりストレス耐性が向上したパン酵母変異株の分離と特性解析**
**10:20** ○高木博史[1]，Tsolmonbaatar Ariunzaya[1]，橋田恵介[1]，杉本幸子[1]，渡辺大輔[1]，古川周平[2]（[1]奈良先端大バイオ，[2]オリエンタル酵母工業）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**3C24a06　実用酵母中心代謝の比較プロテオミクス**
**10:45** ○松田史生，植林希代加，清水　浩（阪大情報）

**3C24a07　TCA 回路酵素遺伝子過剰発現が *Mortierella alpina* の脂質生産性に及ぼす影響**
**11:00** ○島田良美[1]，安藤晃規[1]，和泉自泰[2]，馬場健史[2]，岸野重信[1]，櫻谷英治[3]，島　純[4]，小川　順[1]（[1]京大院・農，[2]九大・生医研，[3]徳島大・生物資源，[4]龍谷大・農）

**3C24a08　*Euglena gracilis* のワックスエステル発酵阻害による蓄積代謝物の変換**
**11:15** ○中本雅俊[1,3]，金谷重彦[1]，有田正規[2]，太田大策[3]（[1]奈良先端情報，[2]国立遺伝学研究所，[3]大府大生命）

**3C24a09　ラビリンチュラ類 *Aurantiochytrium* 属のメタボローム解析による育種標的の探索と脂質生産量の向上**
**11:30** ○渡邉研志[1,3]，Arafiles Kim[1,3]，岡村好子[1,3]，田島誉久[1,3]，松村幸彦[2,3]，中島田豊[1,3]，秋　庸裕[1,3]（[1]広島大院・先端研，[2]広島大院・工，[3]JST・CREST）

**3C24a10　糸状菌の先端生長における極性制御機構の解析（奨励賞受賞講演）**
**11:45** ○竹下典男（筑波大学生命環境系）

## C24 会場　午後の部（14:00〜18:05）

微生物―遺伝子－発現制御，トランスクリプトーム―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**3C24p01　油糧糸状菌の分子育種基盤の構築と有用油脂生産への展開（奨励賞受賞講演）**
**14:00** ○安藤晃規（京都大学大学院農学研究科）

**3C24p02　油糧微生物 *Mortierella alpina* 1S-4 株の分子育種に有用なプロモーターの探索および評価**
**14:15** ○奥田知生[1]，安藤晃規[1]，櫻谷英治[1,2]，鎌田　望[3]，

落合美佐[3]，小川　順[1]（[1]京大院・農，[2]徳島大院・生物資源産業，[3]サントリーグローバルイノベーションセンター）

**3C24p03　麹菌 *Aspergillus oryzae* 酸性プロテアーゼ欠損株の転写解析**

**14:30**　°佐藤栄里，前田　浩，上野絢子，竹内道雄，山形洋平（東京農工大農）

**3C24p04　黄麹菌 *Aspergillus oryzae* pepstatin insensitive protease のプロモーター領域の解析**

**14:45**　°関　桃子，竹内真理衣，山形洋平（農工大）

**3C24p05　染色体重複技術を用いた麹菌二次代謝系制御因子の探索**

**15:00**　°高橋　理，小山泰二（野田産業科学研究所）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**3C24p06　糸状菌の sirtuin E は対数期から定常期にかけてのグローバルな遺伝子発現の変化を制御する**

**15:25**　°伊藤英里子，志水元亨，桝尾俊介，高谷直樹（筑波大・生命）

**3C24p07　糸状菌 MADS box タンパク質 McmA の多様な機能**

**15:40**　°玉城彰悟[1]，　國武絵美[2]，　李　諾[2]，　金丸京子[2]，木村　真[2]，小林哲夫[2]（[1]名大農，[2]名大院・生命農）

**3C24p08　土壌細菌 *Burkholderia multivorans* の土壌における適応機構の解明**

**15:55**　°田上　諒，西山依里，大坪嘉行，永田裕二，津田雅孝（東北大院生命）

**3C24p09　土壌細菌 *Burkholderia multivorans* における鉄硫黄クラスター生合成系の転写制御機構の解析**

**16:10**　°野々山翔太，　佐藤拓哉，　岸田康平，　大坪嘉行，永田裕二，津田雅孝（東北大院生命科）

**3C24p10　RNA-Seq を用いた冬虫夏草（*Cordyceps militaris*）の感染過程における遺伝子の網羅的解析**

**16:25**　°鈴木智大[1]，　道羅英夫[2]，　崔　宰熏[2,3]，　鈴木貴也[4]，加藤竜也[2,3]，朴　龍洙[2,3,5]，三家本利之[6]，佐伯　潤[6]，河岸洋和[2,3,5]（[1]宇都宮大・バイオ，[2]静岡大・グリーン研，[3]静岡大・農，[4]静岡大・理，[5]静大院・創造，[6]にちはら総研）

**p11〜p15 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**3C24p11　緑膿菌の新規シアン応答転写調節因子の機能解析**

**16:50**　°多田羅圭，石井正治，新井博之（東大院農生科・応生工）

**3C24p12　好気性光合成細菌 *Roseobacter denitrificans* の光合成色素生産における光受容体タンパク質の役割**

**17:05**　°山本麻衣子，石井正治，新井博之（東大院農生科・応生工）

**3C24p13　*Pseudomonas* 属細菌における Class II LitR を介した光応答メカニズムの解明**

**17:20**　°小林　暢，丸山貴史，上田賢志，高野英晃　（日大生資科・生命セ）

**3C24p14　青色光による Class III LitR を介した葉酸合成促進メカニズムの解明**

**17:35**　°角　悟，　西山辰也，　高野（白鳥）初美，　上田賢志，高野英晃（日大生資科・生命セ）

**3C24p15　放線菌 *Streptomyces griseus* における GPCR 様制御系 Cvn1 と転写調節因子 BldD の制御的関係性の解析**

**17:50**　°天野泰介，上田賢志，高野英晃　（日大生資科・生命セ）

## C25 会場　午前の部（9:20〜12:00）

### 微生物―物質生産－発酵（二次代謝産物，抗生物質，ペプチド，生理活性物質）―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**3C25a01　抗生物質異種生産のためのリグノセルロース資化性 *Streptomyces* 属放線菌の探索**

**9:20**　°春日　和，　柴田彩香，　木村花菜子，　牟田口祐太，志村洋一郎，小嶋郁夫（秋田県大生資）

**3C25a02　アラキドン酸含有脂質を高蓄積する緑藻株の単離**

**9:35**　°加藤康夫，村井俊介，野村泰治（富山県大・生工研セ）

**3C25a03　紅麹発酵産物の神経保護作用の探索**

**9:50**　°松本亜里奈，橘信二郎，外山博英（琉球大学農学部）

**3C25a04　発酵法により得たチーズフレーバーの香気特性**

**10:05**　°西川　卓，青山武史，服部祥治，佐野恵右，高岡秀明（曽田香料株式会社）

**3C25a05　植物生長促進細菌の単離と養液栽培における利用**

**10:20**　°小林誠治[1]，中岡知規[2]，宮澤知愛[1]，阿野貴司[1,2]，岡南政宏[1,2]（[1]近畿大・生物理工，[2]近畿大院・生物理工）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**3C25a06　だだちゃ豆の根圏放線菌による植物生長促進活性の評価**

**10:45**　°佐々木伸啓，斎藤菜摘（鶴岡高専）

**3C25a07　植物生育促進根圏細菌（PGPR）*Paenibacillus sp.* FPU-37 株は植物の感染特異的タンパク質を誘導する**

**11:00**　°石田瑠美[1]，　吉見僚太[1]，　笠原康一[2]，　藤井　豊[3]，奥　直也[4]，木元　久[1]（[1]福井県大院・生物資源，[2]福井シード・ベジプロ，[3]福井大・医，[4]富山県大・工）

**3C25a08　GAM 培地を用いたヒト腸内細菌最優勢 32 種の培養及び短鎖脂肪酸の生産能とその代謝経路の *in silico* 予測**

**11:15**　°栗原　新[1]，　後藤愛那[2]，　奈良未沙希[1]，　杉山友太[1]，阪中幹祥[1]，　谷内寛之[1]，　北方　彩[1]，　奥田修二郎[3]，　片山高嶺[1,2]，（[1]石川県大生資環，[2]京大生命，[3]新潟大医歯）

**3C25a09　ヒト腸内細菌最優勢種の菌体内および培養上清における生育段階別のポリアミン解析と新規ポリアミン合成・輸送系存在についての *in silico* 予測**

**11:30**　°奈良未沙希[1]，　杉山友太[1]，　阪中幹祥[1]，　奥田修二郎[2]，片山高嶺[1,3]，栗原　新[1]（[1]石川県大生資環，[2]新潟大医歯，[3]京大生命）

**3C25a10　放線菌に散在する潜在的二次代謝関連遺伝子の融合発現に向けた新培養法の考案と検証**

**11:45**　°丸山友子[1]，保坂　毅[2]（[1]信州大院総合理工，[2]信州大バイオメディカル研）

## C25 会場　午後の部（14:00〜18:05）

### 微生物―物質生産－発酵（二次代謝産物，抗生物質，ペプチド，生理活性物質）―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**3C25p01　大腸菌によるアミノプロピルカダベリンの生産**

**14:00**　°松岡利奈[1]，中村篤央[2]，松本光晴[2]，鈴木秀之[1]（[1]京都工繊大・応生，[2]協同乳業研究所）

**3C25p02　大腸菌によるトリテルペンの生産**

**14:15**　°竹村美保，三沢典彦（石川県大）

**3C25p03　アシル基転移酵素遺伝子の破壊によるモノアシル型マンノシルエリスリトールリピッドの生産株の創出**

**14:30**　°雜賀あずさ[1]，　小池英明[2]，　福岡徳馬[1]，　山本周平[3]，岸本高英[3]，森田友岳[1]（[1]産総研・機能化学，[2]産総研・生物プロセス，[3]東洋紡㈱・敦賀バイオ研）

**3C25p04　パスウェイエンジニアリングを施した大腸菌によるセスキテルペン生合成の最適条件検討**

**14:45**　°須藤尚史[1]，　八反順一郎[1]，　竹村美保[1]，　原田尚志[2]，新藤一敏[3]，三沢典彦[1]（[1]石川県大・生資研，[2]鳥大院生応工，[3]日女大・家政）

**3C25p05　Development of terpenoid production platform using Streptomyces reveromyceticus**

**15:00**　°Ammara KHALID[1,2]，Hiroshi Takagi[1]，Suresh Panthee[1]，Hiroyuki Osada[1,2]，Shunji Takahashi[1]（[1]RIKEN, CSRS. Chemical Biology group., [2]Saitama University）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**3C25p06　*Rhodosporidium paludigenum* BS15 株よる菌体外脂質生産**

**15:25** ○真野潤一[1], 小野裕嗣[2], 池 正和[1], 徳安 健[1], 橘田和美[1], 北岡本光[1]（[1]農研機構食品研, [2]農研機構高度解析センター）

**3C25p07 低温増殖性乳酸菌 *Lactobacillus sakei* UONUMA-3 株のカロテノイド産生と環境ストレスの影響**

**15:40** ○西脇俊和, 小林和也, 渡辺 聡（新潟農総研食研セ）

**3C25p08 オルニチン由来アルカロイドの微生物生産系の構築にむけて**

**15:55** ○長谷部文人, 大石和敬, 谷美生夏, 相沢光輝, 川嶋智佳, 鮒 信学（静岡県大・食栄）

**3C25p09 腸内マイクロバイオーム内の異菌種間の独立代謝系を介したプトレッシン産生経路**

**16:10** ○北田雄祐[1], 東樹宏和[2], 栗原 新[3], 松本光晴[1]（[1]協同乳業・技術開発, [2]京大人環, [3]石川県大・生資環）

**3C25p10 放線菌 *Streptomyces lividans* による UV 吸収物質シノリンの効率生産**

**16:25** ○山本省吾[1], 松本 淳[1], 曽田匡洋[1], 池田治生[2], 劉 暁麗[1]（[1]長瀬産業株式会社, [2]北里大・北里生命研）

**p11〜p15 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**3C25p11 麹菌群の 14-deacetyl astellolide A(14-DAA)と 14-deacetyl astellolide B(14-DAB)の生産性に関する研究**

**16:50** ○齊藤亮太[1], 梅尾美幸[1], 織田 健[1], 篠原靖智[2], 小山泰二[2], 岩下和裕[1,3]（[1]酒総研, [2]野田産研, [3]広大院・先端研）

**3C25p12 油性酵母（*Lipomyces starkeyi*）によるアルテミシニン前駆体の生産**

**17:05** ○小島 基[1], 鈴木宗典[1], 金本浩介[1], 石井 純[2], 近藤昭彦[2], 播本孝史[1]（[1]神戸天然物化学㈱, [2]神戸大院・科学技術イノベーション）

**3C25p13 非リボソームペプチド rufomycin の生合成に関与するチロシン 3-ニトロ化酵素の同定**

**17:20** ○冨田宏矢[1,2], 勝山陽平[1,2], 大西康夫[1,2]（[1]東大院・農生科・応生工, [2]JST, CREST）

**3C25p14 食後高血糖抑制物質 DNJ 及び他アザ糖生産量の，*B. amyloliquefaciens* 菌株間における差異**

**17:35** ○山岸賢治[1], 高須蒼生[2], 伊藤隼哉[2], 池田亮一[3], 木村俊之[1], 仲川清隆[2], 宮澤陽夫[4]（[1]農研機構食品研究部門, [2]東北大農, [3]㈱旭松食品, [4]東北大未来科学技術共同研究センター）

**3C25p15 ジャトロファ搾油残渣を培養基質とした紅麹菌発酵産物の抗酸化能**

**17:50** ○仲眞弘樹[1], 橘信二郎[1], SUNTORNSUK Worapot[2], 名城 龍[1]（[1]琉大農, [2]キングモンクット工科大学）

## C26 会場 午前の部（9:20〜12:00）

微生物―物質生産－酵素，タンパク質―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**3C26a01 合成生物学的手法によるエチレン生成シアノバクテリアの改良**

**9:20** ○神藤定生[1], 中尾領亜[2], 坂本拓都[2], 細田晃文[2], 田村廣人[2]（[1]名城大理工, [2]名城大農）

**3C26a02 好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* HTA426 において誘導される変異誘発機構の解析**

**9:35** ○鈴木宏和[1], 竹谷達成[2], 小林淳平[1], 大城 隆[1]（[1]鳥取大院・工, [2]鳥取大・工）

**3C26a03 好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* HTA426 を宿主とする遺伝子発現システムの改良**

**9:50** ○水野 樹[1], 村田くるみ[2], 八木寿梓[3], 大城 隆[1], 鈴木宏和[1]（[1]鳥取大院・工, [2]鳥取大・工, [3]鳥取大・工・GSC）

**3C26a04 ピキア酵母用再利用可能ベクター**

**10:05** ○渋井達郎, 原 宏佳, 坂口大介（日本獣医生命科学大学）

**3C26a05 酵母の胞子を利用したカプセル化クレアチニナーゼ及びクレアチナーゼの作成**

**10:20** ○中西秀樹, KONG Jun, 高 暁冬（江南 大・生物工程）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**3C26a06 糸状菌由来の酵素遺伝子は大腸菌でどの程度発現するのか？**

**10:45** ○紙野 圭, 前田秀可, 島村麻美子（製品評価技術基盤機構）

**3C26a07 tRNA の稼働率に着目した物質生産性を向上させる方法**

**11:00** ○廣瀬修一（長瀬産業株式会社）

**3C26a08 MqsR を介した目的タンパク質のみを生産可能な発現系の構築**

**11:15** ○釋 真緒[1], 井上正順[2], 山口良弘[1,3]（[1]阪市大院理, [2]ラトガース大, [3]阪市大複合先端研）

**3C26a09 Advanced technology of recombinant protein expression through LEA peptide co-expression system**

**11:30** ○Nishit Pathak, Shinya Ikeno（Kyutech）

**3C26a10 帰納法による可溶性発現技術の開発**

**11:45** ○松井大亮[1,2], 浅野泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ, [2]JST, ERATO）

## C26 会場 午後の部（14:00〜18:20）

微生物―物質生産－微生物変換，微生物酵素反応―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**3C26p01 枯草菌を宿主とした L-gluconate 生産系の開発**

**14:00** ○久住夏紀[1], 清水 哲[1], 吉田健一[2], 中村 顕[1]（[1]筑波大・生命環境, [2]神戸大・科技イノベ）

**3C26p02 グルクロン酸とフルクトースからなるオリゴ糖の酵素合成**

**14:15** ○保坂浩貴[1], 徳田亜佐美[1], 平野貴子[2], 袴田 航[1,2], 田代 充[3], 西尾俊幸[1,2]（[1]日大院生資科, [2]日大生資科, [3]明星大理工・総合理工）

**3C26p03 グルクロン酸アミドとフルクトースから成るオリゴ糖の酵素合成**

**14:30** ○溝口早織[1], 平野貴子[2], 袴田 航[1,2], 田代 充[3], 西尾俊幸[1,2]（[1]日大院生資科, [2]日大生資科, [3]明星大理工）

**3C26p04 グリコシダーゼの糖転移作用を利用した新規オリゴ糖の合成及びプレバイオティクスとしての評価**

**14:45** ○坂本洋平[1], 西垣あずさ[2], 松井彩香[2], 荒川浩輔[2], 平野貴子[2], 袴田 航[1,2], 田代 充[3], 西尾俊幸[1,2]（[1]日大院生資科, [2]日大生資科, [3]明星大理工）

**3C26p05 キチンオリゴ糖を原料とした新規 GlcNAc 含有ヘテロオリゴ糖の酵素合成**

**15:00** ○上原旭輝[1], 森山芽衣[2], 平野貴子[2], 袴田 航[1,2], 西尾俊幸[1,2]（[1]日大院生資科, [2]日大生資科）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**3C26p06 廃グリセリンからのエリスリトール変換における培養条件の検討**

**15:25** ○安彦良祐[1], 岩田悠志[1], 村上紀里子[3], 東田英毅[3], 渡邉泰祐[1,2], 荻原 淳[1,2], 春見隆文[1,2]（[1]日大生資科・生命化, [2]日大院生資研究科・生資利用, [3]株式会社ちとせ研究所）

**3C26p07 アブラナ科植物植栽地における大気中微量硫黄化合物である硫化カルボニルの発生**

**15:40** ○正木啓仁, 関田真奈, 片山葉子（農工大）

**3C26p08 海洋性硫黄酸化細菌の COS 分解特性**

**15:55** ○猪原英之[1], 堀 知行[2], 青柳 智[2], 高崎みつる[3], 片山葉子[1]（[1]東京農工大院農, [2]産総研・環境管理, [3]石巻専修大理工）

**3C26p09 *Thiobacillus thioparus* THI115 の硫化カルボニル加水分解酵素の基質認識機構の解明**

**16:10** ○小川貴弘[1], 野口恵一[1], 尾高雅文[2], 養王田正文[1], 片山葉子[1]（[1]東農工大院, [2]秋田大院・理工）

**3C26p10 微生物による金属鉄腐食プロセスの解析**

**16:25** ○井上達也[1], 平野伸一[2], 松本伯夫[2], 新井博之[1],

石井正治[1]（[1]東大　農生科，[2]電中研）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**3C26p11　コリネ型細菌を用いたロドコッカス属細胞由来 *btf* 遺伝子群によるベンゾトリフルオリドの脱フッ素化機構の解析**
**16:50**　◦佐々野晴花，矢野憲一，岩井伯隆，和地正明（東工大・生命理工学院）

**3C26p12　クルクミン代謝微生物の探索**
**17:05**　◦石上佳奈，橋本義輝，ハサニナサブアザム，熊野匠人，小林達彦（筑波大院 生命環境）

**3C26p13　ヘテロ三環式化合物を分解する微生物の探索**
**17:20**　◦永久保利紀，熊野匠人，橋本義輝，小林達彦（筑波大院生命環境）

**3C26p14　スチルベン化合物の微生物代謝**
**17:35**　◦熊野匠人，瀧下友理，橋本義輝，小林達彦　（筑波大院生命環境）

**3C26p15　レスベラトロールをピセアタンノールに変換する微生物の探索**
**17:50**　◦古屋俊樹[1,2]，伊巻尚人[1]，齋　政彦[3]，木野邦器[1]（[1]早大理工・応化，[2]東理大理工・応生，[3]森永製菓㈱）

**3C26p16　6-ジンゲロールの微生物反応による配糖化に関する研究**
**18:05**　◦上田　誠[1]，松本里佳[1]，堀　　渚[1]，佐藤浩志[2]（[1]小山高専物質工学科，[2]日生バイオ株式会社）

## J27 会場　午前の部（9:20〜12:00）

環境科学・バイオマス利用
―環境保全, 浄化技術工学, バイオレメディエーション, バイオマス, バイオマス変換，バイオ燃料，バイオ化成品―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**3J27a01　難分解性芳香族化合物資化性好熱性細菌の探索と機能解析**
**9:20**　◦徳田裕太[1]，夷子博将[2]，岩田健一[1]　([1]芝工大院シ，[2]芝工大シ生）

**3J27a02　カルバゾール資化性海洋性細菌の分解系遺伝子の機能解析**
**9:35**　◦森屋　純，岩田健一（芝工大院シ）

**3J27a03　ヒ素超蓄積植物モエジマシダを用いたヒ素汚染土壌の浄化**
**9:50**　◦宮内啓介[1]，　黄　毅[2]，　高木正樹[1]，　東海林翼[1]，北島信行[3]，井上千弘[2]，遠藤銀朗[1]（[1]東北学院大工，[2]東北大院環境，[3]㈱フジタ）

**3J27a04　セレン蓄積植物ブロッコリースプラウトにおける亜テルル酸還元系**
**10:05**　◦武田　徹，中馬康輔（近畿大農・バイオ）

**3J27a05　セレン酸還元細菌 *Pseudomonas stutzeri* NT-I 株を利用したセレン汚染土壌の不溶化処理(その 1)**
**10:20**　◦福澤文人[1]，　大塚　治[2]，　山下光雄[1]，　西里　亮[3]，奥野　稔[3]，武藤宏行[3]（[1]芝浦工大 工 応化，[2]芝浦工大 SIT 総合研究所 レアメタルバイオリサーチセンター，[3]ケー・エフ・シー）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**3J27a06　*Pseudomonas stutzeri* NT-I 株を利用したセレン汚染土壌の不溶化処理(その 2)**
**10:45**　◦大塚　治[1]，　福澤文人[2]，　山下光雄[1,2]，　西里　亮[3]，奥野　稔[3]，武藤宏行[3]（[1]芝浦工大 SIT 総研 レアメタルバイオリサーチセンター，[2]芝工大応化，[3]株式会社ケー・エフ・シー）

**3J27a07　微生物代謝による放射性核種 Sr の不溶化処理に向けた浄化研究**
**11:00**　◦笠原祐太郎[1]，　堀池　巧[2]，　土津田雄馬[2]，　山下光雄[1,2]（[1]芝工大院理工，[2]芝工大 SIT 総研 レアメタルバイオリサーチセンター）

**3J27a08　在来乳酸菌を活用した島豆腐おからサイレージの開発**
**11:15**　◦高屋朋彰，大嶋旭昇，エンフバータルブルガン（小山高専・物質）

**3J27a09　こんにゃく飛粉の糖化液と培養資源としての検討**
**11:30**　◦宮越俊一[1]，　大竹　遥[1]，　石田　悠[1]，　福本亮平[2]，鎌田　直[2]，高田式久[3]（[1]群馬高専，[2]群栄化学工業，[3]雪国アグリ）

**3J27a10　油脂資化性酵母のラードを炭素源とした場合の培養について**
**11:45**　◦小林由衣乃[1]，　日下部征信[1]，　竹園　恵[1]，　中島敏明[2]，茂野俊也[3]，小野寺正幸[1]（[1]新潟工大工，[2]筑波大院生命環境，[3]つくば環微研）

## J27 会場　午後の部（14:00〜18:20）

環境科学・バイオマス利用
―バイオ電池関連，バイオマス，バイオマス変換，バイオ燃料，バイオ化成品―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**3J27p01　焼酎粕を用いた微生物燃料電池の運転条件の検討**
**14:00**　◦飯ケ谷玲央，井上謙吾（宮崎大院農）

**3J27p02　微生物燃料電池の発電に必須な OmcZ の生産メカニズムの解明と機能解析**
**14:15**　◦甲斐絢子，徳石崇宏，河野好裕，榊原陽一，水光正仁，井上謙吾（宮大院農）

**3J27p03　超好熱菌由来酵素を用いた L-プロリンを基質とする燃料電池の構築**
**14:30**　◦殿岡愛菜[1]，田中志乃[2]，小松丈紘[1]，山崎晃司[1]，坂元博昭[1,5]，里村武範[2,5]，櫻庭春彦[3]，大島敏久[4]，末信一朗[1,2,5]　([1]福井大院・工・繊維，[2]福井大院・工・生物応用化，[3]香川大農，[4]大阪工大，[5]福井大・生命セ）

**3J27p04　バイオ電池への応用を目的としたデバイス上へのマルチエンザイムシステムの構築**
**14:45**　◦小松丈紘[1]，　山崎晃司[1]，　坂元博昭[1,3]，　里村武範[2,3]，櫻庭春彦[4]，大島敏久[5]，末信一朗[1,2,3]（[1]福井大院・工・繊維，[2]福井大院・工・生物応用化，[3]福井大学・生命セ，[4]香川大農，[5]大阪工大）

**3J27p05　*Shewanella oneidensis* MR-1 株における水素酸化に伴う電流生成機構**
**15:00**　◦廣瀬篤弥，高妻篤史，渡邉一哉（東薬大生命）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**3J27p06　標準型 NiFe ヒドロゲナーゼと酸化還元ポリマーによる両方向触媒反応系の構築**
**15:25**　◦白岩咲衣子，北隅優希，白井　理，加納健司（京大院農）

**3J27p07　$H_2$/air($O_2$) biofuel cell based on gas diffusion system**
**15:40**　◦Hongqi XIA，Keisei SO，Yuki KITAZUMI，Osamu SHIRAI，Kenji KANO（Kyoto Univ.）

**3J27p08　気相の二酸化炭素を直接還元する新奇バイオカソードの構築**
**15:55**　◦阪井研人[1]，北隅優希[1]，白井　理[1]，高木一好[2]，加納健司[1]（[1]京大院農，[2]立命館大）

**3J27p09　究極の微小電極型アンペロメトリックグルコースバイオセンサの追求**
**16:10**　◦松井由紀菜，北隅優希，白井　理，加納健司（京大院農）

**3J27p10　電気を還元力とした鉄酸化細菌による二酸化炭素からの有用物質生産**
**16:25**　◦平野伸一，長岡　亨，松本伯夫（電中研）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**3J27p11　無機/生体ハイブリッド光触媒を用いた水分解による水素生成**
**16:50**　◦本田裕樹[1]，　渡邊源規[1]，　萩原英久[1,2]，　伊田進太郎[1,2]，石原達己[1,2]（[1]九大 WPI-I2CNER，[2]九大工）

**3J27p12　*Clostridium paraputrificum* の乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子破壊による水素ガス生産増強**
**17:05**　◦木村哲哉，吉田　稜，栗冠真紀子，栗冠和郎（三重大生資）

**3J27p13　嫌気性汚泥から分離した *Clostridium* 属細菌の水素発酵能の評価**
**17:20**　◦若井祐樹，大西章博，藤本尚志，鈴木昌治（東農大）

**3J27p14　*Megasphaera elsdenii* の水素生産特性と乳酸発酵を利用した水素生産システムの可能性**
**17:35**　◦小林邑弥，大西章博，藤本尚志，鈴木昌治（東農大）
**3J27p15　メタン発酵による生分解性プラスチックの分解特性**
**17:50**　◦曽　厚嘉，大西章博，藤本尚志，鈴木昌治（東農大）
**3J27p16　導電性ナノ粒子カーボンブラックがメタン発酵へ与える影響の解明**
**18:05**　◦藤縄和輝[1]，高妻篤史[1]，上野嘉之[2]，渡邊一哉[1]（[1]東薬大生命，[2]鹿島技術研究所）

## J28 会場　午前の部（9:35〜11:45）

植物―生物間相互作用，その他―

**a02〜a05 発表者の接続時間 9:25〜9:35**

**3J28a02　CRISPR/Cas9 system を用いたオウレンのゲノム編集**
**9:35**　◦浜　竜哉，西尾　洋，山田泰之，佐藤文彦（京大院・生命科学）
**3J28a03　モモ花粉稔性の高精度 DNA マーカーの開発**
**9:50**　◦小田賢司[1]，原美由紀[1]，田村隆行[2]，日原晴介[2]（[1]岡山県農総セ生科研，[2]岡山県農総セ農研）
**3J28a04　SDI1 によるグルコシノレート生合成の抑制機構の解析**
**10:05**　◦草島美幸[1]，丸山明子[2]，仲下英雄[1]（[1]福井県大生資，[2]九大農）
**3J28a05　植物共生微生物が誘導する病害抵抗性のメカニズムの解析**
**10:20**　◦藤田萌香[1]，　草島美幸[1]，　奥村泰子[1]，　西内　巧[2]，仲下英雄[1]（[1]福井県大生資，[2]金沢大）

**a06〜a09 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**3J28a06　窒素固定能を持つシアノバクテリア *Nostoc* sp. を共生させるソテツリターに含まれるホルモゴニア分化誘導因子の探索**
**10:45**　◦西塚紘明，橋床泰之（北大院農）
**3J28a07　植物の罹病応答が食害虫の嗜好性に与える影響の解析**
**11:00**　◦植田浩一，釘宮聡一，田端　純，光原一朗，北本宏子（農研機構）
**3J28a08　植物感染性線虫に対する誘引物質の探索**
**11:15**　◦大田守浩[1]，　井田隆徳[2]，　橋口正嗣[3]，　明石　良[3]，島岡知恵[1]，鈴木れいら[1]，石田喬志[1]，澤進一郎[1]（[1]熊大自然科学，[2]宮大フロンティア，[3]宮大農）
**3J28a09　サツマイモネコブセンチュウの巨大細胞形成過程におけるエフェクターたんぱく質 MjD15 の機能解析**
**11:30**　◦光増可奈子[1]，　豊島主峰[2]，　山口泰華[1]，　石田喬志[3]，澤進一郎[1]（[1]熊大院 先端科学，[2]熊大院 自然科学，[3]熊大 IROAST）

## J28 会場　午後の部（14:00〜18:20）

環境科学・バイオマス利用
―バイオマス，バイオマス変換，バイオ燃料，バイオ化成品―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**3J28p01　ポリエステル生産菌 *Ralstonia eutropha* の補充経路改変によるポリヒドロキシアルカン酸生合成への影響解析**
**14:00**　◦洞口萌実，清水理恵，折田和泉，中村　聡，福居俊昭（東工大・生命理工学院）
**3J28p02　大腸菌を宿主とした人工経路によるグルコースからのポリ(3-ヒドロキシブタン酸-*co*-3-ヒドロキシヘキサン酸)生合成**
**14:15**　◦齊藤　周，Chayatip Insomphun，折田和泉，中村　聡，福居俊昭（東工大・生命理工学院）
**3J28p03　パルプ製造廃液を炭素源とした乳酸ベースポリマーの生産**
**14:30**　◦大井俊彦[1,2]，滝沢憲治[1,2]，松本謙一郎[1]，田口精一[1,2]（[1]北大院工，[2]JST-CREST）
**3J28p04　組換え大腸菌による乳酸ポリマー生産のためのキシロースを炭素源とした高密度培養**
**14:45**　◦滝沢憲治[1,2]，　Ribordy Greg[3]，　山崎貴史[1]，　松本謙一郎[1]，大井俊彦[1,2]，Zinn Manfred[3]，田口精一[1,2]（[1]北大院工，[2]JST-CREST，[3]HES-SO）
**3J28p05　非天然ポリステル合成のための重合酵素の高活性化**
**15:00**　◦松本謙一郎[1,2]，　大石健太[1]，　大井俊彦[1,3]，　田口精一[1,3]（[1]北大工，[2]ALCA-JST，[3]CREST-JST）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**3J28p06　*Burkholderia* 属細菌によるポリヒドロキシブタン酸の合成**
**15:25**　◦山端勇貴，幸田有以，花角優太，山田美和，下飯　仁（岩大農）
**3J28p07　組換え *R. eutropha* による糖からの P（3HB-*co*-3HA）の生合成**
**15:40**　◦倉富優季[1]，　脇田　和[2]，　後藤早希[1]，　外村彩夏[2]，田中賢二[3]，松崎弘美[1,2]（[1]熊県大院・環境共生，[2]熊県大・環境共生，[3]近大・産理工）
**3J28p08　組換え大腸菌による新規乳酸ベースポリマーの生合成**
**15:55**　◦後藤早希[1]，　留野菜月[2]，　外村彩夏[2]，　田口精一[3]，松本謙一郎[3]，阿部英喜[4]，田中賢二[5]，松崎弘美[1,2]（[1]熊本県大院・環境共生，[2]熊本県大・環境共生，[3]北大院・工，[4]理研，[5]近大・産理工）
**3J28p09　(*R*)-3-ヒドロキシ酪酸生産における好気発酵条件の影響**
**16:10**　◦世嘉良宏斗[1]，　花城隆二[1]，　合田雅浩[1]，　照屋盛実[1]，常盤　豊[2]（[1]沖縄県工技セ，[2]産業技術総合研究所）
**3J28p10　発酵(*R*)-3-ヒドロキシ酪酸を用いて化学合成したポリ-3-ヒドロキシ酪酸の生分解**
**16:25**　◦常盤　豊[1]，中山敦好[1]，楽　隆生[2]，世嘉良宏斗[3]（[1]産総研，[2]甲南化工，[3]沖縄県工技セ）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**3J28p11　脱脂米糠からのリン・タンパク質抽出条件の最適化による回収産物の品質に与える影響**
**16:50**　◦玉田陽集[1]，遠藤修二郎[2]，渡辺昌規[1]（[1]山形大院農，[2]三和油脂株式会社）
**3J28p12　木質バイオマス減容化に向けた樹皮糖化産物のメタン発酵阻害に関する研究**
**17:05**　◦尾藤真衣[1]，　大塚祐一郎[2]，　中村雅哉[2]，　中島田豊[3]，新谷政己[1]，金原和秀[1]（[1]静大工，[2]森林総研，[3]広大院先端）
**3J28p13　微細藻類ユーグレナにおけるワックスエステル分解酵素の同定**
**17:20**　◦石川孝博[1,2]，　栗原佳恵子[1,2]，　小川貴央[1,2]，　丸田隆典[1,2]，澤　嘉弘[1]，森　　大[3,4]（[1]島大生資科，[2]JST/CREST，[3]慶大先端生命，[4]慶大政策メディア）
**3J28p14　リン酸化プロテオーム解析を用いたワックスエステル代謝制御機構の解明**
**17:35**　◦木村光宏[1]，森　　大[2,3]，石川孝博[1]（[1]島大生資科，[2]慶大先端生命，[3]慶大政策メディア）
**3J28p15　ヘミセルロースのマウスの脂質代謝への影響**
**17:50**　◦布施有里奈[1]，　椎葉　究[1,2]，　小島俊佑[1]，　関本智登[1]，堀内美穂[1]，前村美樹[1]（[1]東京電機大学理工学部，[2]東京電機大学）
**3J28p16　孟宗竹からの抗酸化能を有するオリゴ糖の単離と構造解析**
**18:05**　◦関本智登[1]，前島裕太[2]，椎葉　究[1,2]（[1]東京電機大学大学院，[2]東京電機大学）

## J29 会場　午前の部（9:20〜12:00）

生物科学―糖鎖科学－その他―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**3J29a01　1,5-結合した β-L-アラビノフラノシドを有するオリゴアラビノフラノシドの合成と構造解析**
**9:20**　◦石渡明弘，伊藤幸成(理研)
**3J29a02　チオエーテル基を持つ糖受容体を用いた立体選択的グリコシル化**

**9:35** ○土肥博史[1,2]，小林真己[3]，前川丈武[1]，西田芳弘[2,3]（[1]千葉大院園芸，[2]千葉大･分子キラリティー研究センター，[3]千葉大院融合）

**3J29a03　3'-シアリルラクトースを用いた糖鎖高分子の合成と機能評価**

**9:50** ○田中知成[1]，　周毅テイ[1]，　田本千尋[2]，　紅林佑希[2]，高橋忠伸[2]，鈴木　隆[2]（[1]京工繊大院工芸，[2]静県大薬）

**3J29a04　インフルエンザウイルスの種間伝播機構解明を可能にする異種抗原型糖鎖プローブの開発**

**10:05** ○尾形　慎[1]，　大坪忠宗[2]，　池田　潔[2]，　加藤竜也[3]，朴　龍洙[3]，山中隆史[4]，左　一八[5]（[1]福島高専・物質工，[2]広島国際大・薬，[3]静岡大・グリーン科技研，[4]JRA，[5]会津大・短）

**3J29a05　酵母を発現宿主とした組換え糖タンパク質の調製と Endo-M による糖鎖構造の均一化**

**10:20** ○苫米地祐輔[1]，　加藤紀彦[1,2]，　坂口広大[1]，　千葉靖典[3]，熊田純一[4]，松崎祐二[4]，山本憲二[1]（[1]石川県大・生資工研，[2]京大院・生命，[3]産総研・創薬基盤，[4]東京化成工業）

**a06～a10 発表者の接続時間 10:35～10:45**

**3J29a06　ピロリ由来 α 1,3-フコース転移酵素のシアリルラクトサミン基質への特異的糖転移反応**

**10:45** ○清水弘樹[1]，　長島　生[1]，　作田智美[1]，　蟹江善美[2]，蟹江　治[2]（[1]産総研生物プロセス，[2]東海大先進生命科学）

**3J29a07　ENGase の糖転移活性を検出するための糖鎖プローブの合成**

**11:00** ○石井希実[1]，　須永千恵[1]，　佐野加苗[1]，　吉村弥生[1]，熊田純一[2]，松崎祐二[2]，松尾一郎[1]（[1]群馬大院理工，[2]東京化成工業株式会社）

**3J29a08　連続的グリコシル化反応によるオリゴマンノシドの合成**

**11:15** ○佐野加苗，吉村弥生，松尾一郎（群馬大院理工）

**3J29a09　ヒト UGGT の触媒活性に与えるドメインの解析**

**11:30** ○武田陽一[1,2]，　今村有希[1]，　瀬古　玲[2]，　藤川紘樹[2]，和泉雅之[3]，梶原康宏[3]，伊藤幸成[2,4]　([1]立命館大生命科学，[2]JST ERATO，[3]阪大院理，[4]理研）

**3J29a10　Upregulation of Sialylated N-glycan Expression in Human Hepatoblastoma Cell Line Expressing Hepatitis B Virus**

**11:45** ○Surya Agung Priyambada[1]，Ryo Misaki[1]，Toru Okamoto[2]，Yuta Okamoto[1]，　Takao Ohashi[1]，　Yoshiharu Matsuura[2]，Kazuhito Fujiyama[1]　([1]Laboratory of Applied Microbiology, International Center for Biotechnology, Osaka University, [2]Departement of Molecular Virology, Research Institute for Microbial Disease, Osaka University）

## J29 会場　午後の部（14:30～17:35）

### 生物科学―タンパク質・ペプチド科学－構造，タンパク質・ペプチド科学－機能―

**p03～p05 発表者の接続時間 14:20～14:30**

**3J29p03　超好熱アーキア *Pyrobaculum aerophilum* 由来 galactose-1-phosphate uridylyltransferase の構造解析**

**14:30** ○花川大地[1]，　林　順司[1]，　米田一成[2]，　大島敏久[3]，櫻庭春彦[1]（[1]香川大農，[2]東海大農，[3]大工大工）

**3J29p04　*Bacillus subtilis* 168 由来中性亜鉛プロテイナーゼの 1.1 Å分解能立体構造**

**14:45** ○日ビ隆雄[1]，　植村　誉[1]，　伊藤貴文[1]，　吉水正則[2]，吉浦由里子[2]，宮嶋俊吉[2]，([1]福井県大・生物資，[2]HBI㈱）

**3J29p05　Cleaved 型ニューロセルピンの結晶構造から明らかとなったプロトマー連結領域の不安定化**

**15:00** ○久留宮綾人[1]，　津田美代子[1]，　山崎正幸[2]，　恩田真紀[1]（[1]阪府大理，[2]龍谷大農）

**p06～p10 発表者の接続時間 15:15～15:25**

**3J29p06　ウミシイタケ由来ルシフェラーゼの安定化**

**15:25** ○石橋松二郎[1]，　Laksmi Fina[1]，　新井栄揮[2]，　徳永正雄[1]（[1]鹿大農，[2]量研機構）

**3J29p07　マウス由来フェロモン受容体 V2R 細胞外領域の昆虫培養細胞による組換え発現**

**15:40** ○岩谷　達，安井典久，山下敦子（岡山大院・医歯薬）

**3J29p08　イネ由来ディフェンシンのヒト病原菌に対する抗菌効果とその特性**

**15:55** ○落合秋人[1]，　金岡　巧[1]，　提箸祥幸[2]，　田中孝明[1]，谷口正之[1]（[1]新潟大・自然研，[2]農研機構・北農研）

**3J29p09　卵黄由来の生理活性ペプチド経口投与の骨形成に対する影響**

**16:10** ○豊浦雅義[1]，　中村唱乃[1]，　北浦義昭[2]，　大庭伸介[2]，鄭　雄一[2]（[1]㈱ファーマフーズ，[2]東京大学大学院 工学研究科）

**3J29p10　コメ糠タンパク質酵素加水分解物からのカチオン性ペプチドの精製と同定およびそれらの生理活性の解明**

**16:25** ○谷口正之，亀田光裕，野本貴史，生江俊樹，齊藤健吾，落合秋人，田中孝明（新潟大自然研）

**p11～p13 発表者の接続時間 16:40～16:50**

**3J29p11　機能未知タンパク質の新たなアノテーション手法**

**16:50** ○渡辺誠也（愛媛大院・農）

**3J29p12　分子シャペロン calnexin と相互作用する PDI ファミリータンパク質の探索**

**17:05** ○中尾仁美[1]，瀬古　玲[2]，伊藤幸成[3]，迫野昌文[1]（[1]富大院理工，[2]JST,ERATO，[3]理研）

**3J29p13　CutA1 を用いた分子デザインによりタンパク質間相互作用検出を高感度化する方法**

**17:20** ○今中洋行，伊達弘輝，石田尚之，今村維克（岡山大院自然）

## J30 会場　午前の部（9:20～12:00）

### 生物科学―生物工学－酵素工学・生物反応工学，生物工学－解析技術・方法論―

**a01～a05 発表者の接続時間 9:10～9:20**

**3J30a01　インフルエンザウイルスの高頻度変異膜タンパク質に対する新規阻害剤スクリーニング系の考案**

**9:20** ○西岡良将，　里村　淳，　青木　航，　黒田浩一，　植田充美（京大農）

**3J30a02　活性型組換え蛋白質収量を増大させるレアコドンへの同義置換**

**9:35** ○河原崎泰昌，田中翔大，中野祥吾，伊藤創平，伊藤圭祐（静県大食栄）

**3J30a03　人工的な代謝酵素複合体のゲノム遺伝子導入によるポリケチド化合物の微生物生産**

**9:50** ○吉越健輔[1]，　石澤崇昭[1]，　篠田　優[1]，　平野勝紹[1]，鮒　信学[2]，春木　満[1]，平野展孝[1]（[1]日大・工・生命応用化，[2]静岡県立大・食栄・食品生命科学）

**3J30a04　二種非天然型アミノ酸同時導入による非酵素的活性化可能な安定化トランスグルタミナーゼの生産**

**10:05** ○大竹和正[1]，春名健一[2]，坂本健作[1]（[1]理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター，[2]味の素株式会社 イノベーション研究所）

**3J30a05　有用酵素の基質特異性改変とバイオイソプレン生産への応用**

**10:20** ○折下涼子，白井智量，近藤昭彦（理研 CSRS）

**a06～a10 発表者の接続時間 10:35～10:45**

**3J30a06　MMLV 逆転写酵素，耐熱型 DNA ポリメラーゼおよび DNA/RNA ヘリカーゼの組み合わせによる RNA の高感度検出**

**10:45** ○保川　清[1]，　岡野啓志[1]，　片野裕太[1]，　馬場美聡[1]，藤原綾子[2]，　秀瀬涼太[2]，　藤原伸介[2]，　柳原　格[3]，　宇治家武史[4]，林　　司[4]，兒島憲二[1]，滝田禎亮[1]（[1]京大院農，[2]関西学院大，[3]母子センター，[4]カイノス）

**3J30a07　小型 SPR センサを用いた食中毒菌の新規判定法におけ**

る非対称 PCR 法の最適条件の検討
**11:00** ○長井晴香[1]，　冨岡寛治[1]，　東　信哉[2]，　岩倉宗弘[2]，奥村史朗[3]（[1]久留米高専，[2]九州計測器，[3]福岡県工技セ）

**3J30a08　大腸菌発現システムを用いたシングルヒト B 細胞からの抗乳酸菌ヒトモノクローナル抗体取得**
**11:15** ○内田由乃，加藤晃代，兒島孝明，中野秀雄（名大農）

**3J30a09　緑膿菌 OprM LOOP2 に対する組換え単鎖抗体の大腸菌発現に向けた試み**
**11:30** ○矢野遥香，宮崎未有，良原栄策，小島直也，笹川　昇（東海大）

**3J30a10　標準 RNA を用いた調製 RNA 溶液の分解性評価法に関する研究**
**11:45** ○長谷川丈真[1]，高橋淳子[2]，岩橋　均[1]（[1]岐阜大，[2]産総研）

## J30 会場　午後の部（14:00〜17:50）

生物科学―生物工学－解析技術・方法論，生物工学－細胞培養工学―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**3J30p01　絹タンパク質セリシン加水分解物の細胞培養添加剤としての作用機構**
**14:00** ○寺田　聡[1]，神道紀志[1]，高橋　潤[2]，佐々木真宏[2]（[1]福井大工，[2]セーレン）

**3J30p02　生体分子複雑系の非分離解析技術高度化**
**14:15** ○菊地　淳[1,2,3]，坪井裕理[1]，伊藤研悟[2]，伊達康博[1,2]（[1]理研環境資源，[2]横市院生命医，[3]名大院生命農）

**3J30p03　バイオインフォマティクスを駆使したビッグデータ解析に基づく魚類多様性および環境応答多様性の評価への応用**
**14:30** ○魏　菲菲[1]，　福地　実[2]，　朝倉大河[1,2]，　坂田研二[1]，菊地　淳[1,2,3]（[1]理研 CSRS，[2]横市大院・生命医，[3]名大院・生命農）

**3J30p04　深層学習に支援された代謝プロファイリング技術の構築**
**14:45** ○伊達康博[1,2]，菊地　淳[1,2,3]（[1]理研 CSRS，[2]横市院生命医，[3]名大院生命農）

**3J30p05　二電極式多成分同時電解による電気化学バイオセンシング**
**15:00** ○北隅優希，勝辺隆太郎，白井　理，加納健司（京大院農）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**3J30p06　海洋微生物ラビリンチュラ類における選択マーカーリサイクル法の開発**
**15:25** ○石橋洋平，伊東　信（九大院農）

**3J30p07　渦鞭毛藻の麻痺性貝毒及び生合成中間体のカラムスイッチング HILIC-HILIC-MS-MRM による分析**
**15:40** ○長由扶子[1]，　土屋成輝[1]，　吉岡廉平[1]，　大村卓朗[2]，此木敬一[1]，大島泰克[3]，山下まり[1]（[1]東北大農，[2]LASC，[3]東北大生命）

**3J30p08　マウス白血病ウィルス由来逆転写酵素の N-tailing 活性と解析ツール TraceViewer**
**15:55** ○大坪嘉行，永田裕二，津田雅孝（東北大院生命）

**3J30p09　CRISPR-Cas9 システムを用いた大腸菌ゲノムの遺伝子多重ノックアウト**
**16:10** ○三宅裕可里[1]，石浜　明[2]，山本兼由[1,2]（[1]法政大学生命科学部，[2]法政大・マイクロナノテクノロジーセンター）

**3J30p10　高速 DNA シークエンシングを用いたカブトムシ由来転写因子 Dsx 結合部位ゲノムワイド解析**
**16:25** ○岡　大椰[1]，　兒島孝明[1]，　梶川友也[1]，　後藤寛貴[2]，新美輝幸[3]，井原邦夫[4]，中野秀雄[1]（[1]名大院・生命農・生命技術，[2]名大院・生命農・生物機構，[3]基生研，[4]名大・遺伝子実験施設）

**p11〜p14 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**3J30p11　Fc レセプターを用いたアフィニティ分離剤による抗体医薬品の分離**
**16:50** ○遠藤　諭，寺尾陽介，山中直紀，青木　大，西山しずか，大江正剛（東ソー）

**3J30p12　cDNA display using *E. coli*-based translational system**
**17:05** ○JiCheng Fan[1]，Jasmina Damnjanovic[1]，Takaaki Kojima[1]，Naoto Nemoto[2]，Hideo Nakano[1]（[1]Nagoya Univ.，[2]Saitama Univ.）

**3J30p13　分岐鎖アミノ酸に対する FRET 型蛍光バイオセンサーの開発**
**17:20** ○高橋世菜，垣塚　彰，今村博臣（京大生命）

**3J30p14　微小培養環境システムを用いたバイオフィルム解析チップの開発**
**17:35** ○伏木蒼太郎[1]，　茂木亮介[2]，　佐々文洋[3]，　野村暢彦[2]，鈴木博章[1]，横川雅俊[1]（[1]筑波大院数理物質，[2]筑波大院生命環境，[3]九州大院システム情報）

## J31 会場　午前の部（9:20〜12:00）

植物―遺伝子－機能，発現制御―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**3J31a01　水生植物 Egeria 属と Elodea 属における異型細胞形成の再評価**
**9:20** ○大谷友佑[1]，　植竹祥子[1]，　篠塚　舞[1]，　金澤美加子[1]，伊藤竜一[2]，藤原　誠[1]（[1]上智大理工，[2]琉球大理）

**3J31a02　水生植物オオカナダモの異型細胞分化とその役割**
**9:35** ○藤井春希[1]，　大谷友佑[1]，　金澤美加子[1]，　篠塚　舞[1]，小林永実[1]，伊藤竜一[2]，藤原　誠[1]（[1]上智大理工，[2]琉球大理）

**3J31a03　緑藻クレブソルミディウムの生長とオイルボディ形成過程**
**9:50** ○福本　悠[1]，　湖城　恵[1]，　三坂瑠奈[1]，　立石真希[2]，箸本春樹[2]，伊藤竜一[3]，藤原　誠[1]（[1]上智大理工，[2]神奈川大理，[3]琉球大理）

**3J31a04　シロイヌナズナ葉緑体分裂異常変異体を用いた花粉発生過程における色素体増殖の解析**
**10:05** ○石川浩樹[1]，　佐々木駿[1]，　平野智也[2,3]，　風間裕介[2]，阿部知子[2]，伊藤竜一[4]，藤原　誠[1,2]（[1]上智大・理工，[2]理研・仁科センター，[3]宮崎大・農，[4]琉球大・理）

**3J31a05　出芽酵母の多重遺伝子発現系を利用した紅藻スサビノリ由来脂肪酸鎖長伸長酵素遺伝子の機能解析**
**10:20** ○渡部智弘[1,2]，　長島　生[2]，　菅野陽平[3]，　佐原健彦[2]，扇谷　悟[2]，三上浩司[4]，森田直樹[1,2]（[1]北大院農・基礎環境微生物学，[2]産総研・生物プロセス，[3]道衛研，[4]北大院水産科学・育種生物学）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**3J31a06　Analysis of arsenate reductase gene expression in Pteris vittata**
**10:45** ○SHUJUN WEI[1]，MEI-FANG CHIEN[1]，KAZUKI SUGAWARA[2]，CHIHIRO INOUE[1]（[1]Tohoku Univ.，[2]Seikei Univ.）

**3J31a07　新規バイオマス測定系の確立によるシロイヌナズナ種内雑種で見られる雑種強勢現象の解析**
**11:00** ○杉　直也[1]，草野　都[1]，斉藤和季[2]，柴　博史[1]（[1]筑波大・院生命環境，[2]千葉大・薬）

**3J31a08　トマトにおけるアルドケト還元酵素の遺伝子発現機構と機能解析**
**11:15** ○末川麻里奈，藤川愉吉，江坂宗春（広島大院生物圏）

**3J31a09　アスコルビン酸生合成主要因子 VTC2 の発現を調節する転写因子の機能解析**
**11:30** ○崎下絢子[1]，　瀬古友梨恵[2]，　田部記章[2]，　田中裕之[3]，田茂井政宏[1,2]，重岡　成[1,2]（[1]近畿大院・農・バイオ，[2]近畿大・農・バイオ，[3]宇都宮大・バイオ）

**3J31a10　葉緑体型 *APXII* の選択的スプライシング制御因子の同定**
**11:45** ○田部記章[1]，　大原晨亜[1]，　吉村和也[2]，　田茂井政宏[1]，重岡　成[1]（[1]近畿大・農・バイオ，[2]中部大・応生・食栄）

## J31 会場　午後の部（14:00〜18:20）

植物―植物工学－育種，物質生産，形質転換―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**3J31p01　糖鎖修飾改変植物体によるヒト β-glucoserebrosidase 生産**
**14:00** ○佐藤圭悟[1]，　弓岡仁美[1,2]，　土肥浩一[1]，　磯山純子[1]，大橋貴生[1]，三﨑　亮[1]，藤山和仁[1]（[1]阪大・生工国際セ，[2]大阪成蹊短大・栄養）

**3J31p02　外来タンパク質をイネ種子プロテインボディタイプ I 内部に局在化させるためのプロラミン部分配列の特定**
**14:15** ○佐生　愛[1]，重光隆成[1]，森田重人[1,2]，増村威宏[1,2]（[1]京都府立大学・生命環境，[2]京都府農技セ・生資セ）

**3J31p03　新規なゲノム編集ベクターと高密度水耕栽培法を利用したコメ品質関連遺伝子の多重改変**
**14:30** ○黒田昌治，山口知哉，山川博幹（農研機構・中央農研）

**3J31p04　イネ種子貯蔵タンパク質変異体 *esp2* に由来する交配後代系統における胚乳含有成分の網羅的解析**
**14:45** ○堀　清純[1]，　飯島　健[1]，　山本敏央[1]，　川越　靖[1]，奥西智哉[2]（[1]農研機構作物開発セ，[2]農研機構食品部門）

**3J31p05　維管束分岐の促進，ダイクロマティズム，および上偏生長を利用した花の組換え育種**
**15:00** ○笠島一郎[1,2]，大坪憲弘[1,3]，佐々木克友[1]（[1]農研機構，[2]岩手大農，[3]京都府大生環）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**3J31p06　使用済みカイロを用いた鉄粉被覆種子加工方法の応用研究**
**15:25** ○小路美紀[1]，　岡村麻由[1]，　青木洋賢[2]，　小川智弘[2]，野村正人[2]（[1]近大院・システム工学，[2]近大工）

**3J31p07　シダ植物培養細胞の予備凍結法による超低温保存**
**15:40** ○三國智葉，安部文貴，栗山　昭　（東京電機大 院 理工）

**3J31p08　*Agrobacterium* 法により作出した *Mentha aquatica* 形質転換体の金属耐性**
**15:55** ○田渕　晃，小野里真志，飯塚万結香，栗田将平（信大農）

**3J31p09　陸上植物の進化過程と桂皮酸モノリグノール生合成能の獲得に関する研究**
**16:10** ○古畑美帆[1]，　杉山結郁[1]，　西浜竜一[2]，　山岡尚平[2]，河内孝之[2]，岡澤敦司[1]，太田大策[1]（[1]大阪府大生命環境，[2]京大生命科学）

**3J31p10　Alteration of galactosylation in tobacco cell wall matrix by co-expression of UDP-galactose transporter and UDP-Glc/UDP-Gal epimerase genes.**
**16:25** ○Tayebeh Abedi[1]，Toshihisa Kotake[2]，Nobukazu Tanaka[1]（[1]Hirohima Univ.，[2]Saitama Univ.）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**3J31p11　ソース / シンク能同時強化サツマイモの作出に向けたサツマイモ根特異的プロモーターの単離**
**16:50** ○冨本優美[1]，田部記章[2,5]，田茂井政宏[1,2,5]，菊池　彰[3,5]，横田明穂[4,5]，重岡　成[1,2,5]　（[1]近畿大院・農・バイオ，[2]近畿大・農・バイオ，[3]筑波大・GRC，[4]奈良先端大・先端科技推進セ，[5]JST, CREST）

**3J31p12　ユーグレナへのトランスエノイル CoA 還元酵素遺伝子導入によるバイオ燃料生産性の向上**
**17:05** ○田茂井政宏[1,2]，　野志昌弘[1,2]，　小川貴央[2,3]，　石川孝博[2,3]，重岡　成[1,2]（[1]近大農，[2]CREST JST，[3]島根大生資科）

**3J31p13　実用珪藻 *Chaetoceros gracilis* のバイオファクトリー化に向けた基盤技術の開発**
**17:20** ○伊福健太郎[1]，　閻　東怡[1]，　西出浩世[2]，　山本義治[3]，内山郁夫[2]，菓子野康浩[4]（[1]京大院生命，[2]基生研，[3]岐阜大応用生物，[4]兵県大院生命理学）

**3J31p14　実用珪藻ツノケイソウにおけるリシノール酸生産**
**17:35** ○梶川昌孝[1]，　安部竜樹[1]，　伊福健太郎[1]，　古谷憲一[1]，閻　東怡[1]，　奥田知生[2]，　安藤晃規[2]，　岸野重信[2]，　小川　順[2]，福澤秀哉[1]（[1]京大生命，[2]京大農）

**3J31p15　PaIspS を用いた光合成藻類によるイソプレン生産の試み**
**17:50** ○浅野卓也[1]，　杉山暁史[1]，　伊福健太郎[2]，　奥村智憲[3]，梶川昌孝[2]，福澤秀哉[2]，矢崎一史[1]（[1]京都大学生存圏研究所，[2]京都大学大学院生命科学研究科，[3]大阪府立環境農林水産総合研究所）

**3J31p16　ORANGE 遺伝子過剰発現の *Chlamydomonas reinhardtii* カロテノイド生産への影響**
**18:05** ○澤山茂樹，森川盾毅，三田将平，浦口裕介，中川　聡（京大農）

## J32 会場　午前の部（9:35〜11:45）

植物―植物ホルモン，成長調節物質，遺伝子－構造解析，ゲノム，遺伝，変異，その他―

**a02〜a05 発表者の接続時間 9:25〜9:35**

**3J32a02　担子菌エンドファイトによって誘導される宿主植物の根系発達に関する研究**
**9:35** ○石本真弓，稲次　葵，吉川凌香，岡澤敦司，小川拓水，太田大策（大阪府大　生命環境）

**3J32a03　担子菌エンドファイト *Piriformospora indica* 共生によるシロイヌナズナの側根原基誘導**
**9:50** ○吉川凌香，石本真弓，稲次　葵，岡澤敦司，小川拓水，太田大策（大阪府大 生命環境）

**3J32a04　糖シグナリングによる側枝形成制御の分子機構**
**10:05** ○大鳥久美[1,2]，　田部記章[1,2]，　田茂井政宏[1,2]，　重岡　成[1,2]（[1]近畿大・農・バイオ，[2]JST,CREST）

**3J32a05　酵母細胞壁が誘導する植物の病害応答機構の解明**
**10:20** ○矢口賢臣，高橋公咲，松浦英幸（北大農院）

**a06〜a09 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**3J32a06　シロイヌナズナ内生新規活性アシルポリアミンの探索，機能解析**
**10:45** ○和田隆之介[1]，　山野博之[1]，　岩川純也[1]，　山岸卓矢[1]，彦坂政志[1]，中村英光[1]，森　昌樹[2]，浅見忠男[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]農研機構・生物機能利用研究部門）

**3J32a07　アブシジン酸に着目した根寄生雑草ストライガの寄生戦略の解析**
**11:00** ○藤岡　聖，井上知恵，鮫島啓彰，水谷正治，杉本幸裕（神大院農）

**3J32a08　インゲン未熟種子中のアブシジン酸および 12-オキソフィトジエン酸の脱離エレクトロスプレーイオン化-イメージング質量分析法による可視化**
**11:15** ○扇子拓也[1]，　佐藤　圭[2]，　佐藤　太[3]，　湯本絵美[1]，宮本皓司[1]，横田孝雄[1]，山根久和[1,2]，榎元廣文[1,2]　（[1]帝京大理工，[2]帝京大院理工，[3]日本ウォーターズ株式会社）

**3J32a09　アブシジン酸受容体アンタゴニスト PANMe の強力な抗 ABA 活性とその構造基盤**
**11:30** ○三村尚毅[1]，　朝比奈尚紀[2]，　川島徳晃[2]，　岡本昌憲[3]，須恵雅之[4]，矢嶋俊介[5]，大西利幸[6]，轟　泰司[6]（[1]静大院・創造，[2]静大院・総科技・農，[3]鳥取大・乾燥地研究センター，[4]東農大・生応化，[5]東農大・バイオ，[6]静大・農）

## J32 会場　午後の部（14:00〜18:20）

植物―環境応答，ストレス応答，情報伝達，分化―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**3J32p01　植物香気成分の生合成酵素の機能進化と反応制御機構に関する研究（奨励賞受賞講演）**
**14:00** ○肥塚崇男　（山口大学大学院創成科学研究科）

**3J32p02　植物新規アシルスペルミジン類の探索・機能解析**
**14:15** ○山野博之[1]，　高橋郁夫[1]，　岩川純也[1]，　彦坂政志[1]，

奨励賞受賞講演

中村英光[1]，森　昌樹[2]，浅見忠男[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]農業生物資源研究所）

**3J32p03　シロイヌナズナにおけるサイトカイニンシグナリングによる二次成長制御機構の解析**
**14:30**　◦今村美友[1]，　島田由里菜[1]，　光田展隆[2,3]，　高木　優[2,4]，山篠貴史[1]（[1]名大院生命農，[2]産総研生物プロセス，[3]埼玉大院理工，[4]埼玉大環境科学研究セ）

**3J32p04　イネのファイトアレキシン生産におけるサイトカイニンの生理機能**
**14:45**　◦石塚祐伸[1]，　宮本皓司[1]，　篠崎征喜[1]，　平山琢朗[1]，本江　匡[1]，　酒澤智子[1]，　湯本絵美[1]，　柴田恭美[1]，　横田孝雄[1]，朝比奈雅志[1]，飯野盛利[2]，岡田憲典[3]，山根久和[1]（[1]帝京大・バイオ，[2]大阪市大・理・植物園，[3]東大・生物工学セ）

**3J32p05　イネのジャスモン酸誘導性転写因子 RERJ1 によるリナロール生産制御メカニズムの解明**
**15:00**　◦茂手木敦史[1]，　宮本皓司[1,2]，　山根久和[2]，　新屋友規[3]，ガリスイバン[3]，岡田憲典[1]，野尻秀昭[1]（[1]東京大学大学院生物生産工学研究センター，[2]帝京大学理工学部バイオサイエンス学科，[3]岡山大学資源植物科学研究所）

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**3J32p06　ハイゴケにおける化学防御物質モミラクトン生合成制御機構の解明**
**15:25**　◦照屋美優[1]，　藤原　薫[1]，　宮本皓司[2]，　新屋友規[3]，Galis Ivan[3]，山根久和[2]，林謙一郎[4]，野尻秀昭[1]，岡田憲典[1]（[1]東大・生物工学セ，[2]帝京大・バイオ，[3]岡山大・植物研，[4]岡山理科大・理学部）

**3J32p07　菌の脂肪酸代謝物（BMFA）による植物病害抑制効果などの植物応答へのアプローチ（1）**
**15:40**　◦大野勝也（イビデン）

**3J32p08　菌の脂肪酸代謝物（BMFA）による植物病害抑制効果などの植物応答へのアプローチ（2）**
**15:55**　◦高田久美子，横田晃章，野原偏弘，大野勝也（イビデン株式会社）

**3J32p09　菌の脂肪酸代謝物（BMFA）による植物病害抑制効果などの植物応答へのアプローチ（3）**
**16:10**　◦横田晃章，大野勝也，高田久美子，野原偏弘（イビデン株式会社）

**3J32p10　菌の脂肪酸代謝物（BMFA）による植物病害抑制効果などの植物応答へのアプローチ（4）**
**16:25**　◦野原偏弘（イビデン株式会社）

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**3J32p11　CE オンライン濃縮法を用いた植物粘質物質（Mucilage）中のアニオン分析**
**16:50**　◦東　良太[1]，藤井紳一郎[2]，安保　充[1]（[1]明治大・農，[2]産総研・物質計測）

**3J32p12　グルタチオンによる孔辺細胞アブシシン酸シグナル伝達制御機構の解明**
**17:05**　◦宗正晋太郎，長橋大樹，横井隆志，中村宜督，村田芳行（岡山大院・環境生命）

**3J32p13　デハイドリンの凍結保護活性における K セグメントの疎水性アミノ酸の役割**
**17:20**　◦神谷慶太[1]，遠藤拓弥[1]，亀山阿由子[1]，原　正和[1,2]（[1]静岡大農，[2]静岡大グリーン研）

**3J32p14　イネ幼苗期の低温順化処理は低温ストレス耐性を向上させるとともに収量を増加させる**
**17:35**　◦提箸祥幸，佐藤　裕（農研機構・北農研）

**3J32p15　玄米外観品質における高 $CO_2$ の影響**
**17:50**　◦若松　和[1]，　涌井翔太郎[1]，　猪俣拓也[1]，　金古堅太郎[1]，Baslam Marouane[2]，三ツ井敏明[1,2]（[1]新潟大院，自然科学，[2]新潟大農，応生化）

**3J32p16　The role of protein synthetic system in NPP1 mutant under high temperature and elevated $CO_2$ conditions**
**18:05**　◦MAROUANE BASLAM[1]，TAKUYA INOMATA[2]，KENTARO KANEKO[2]，NODOKA WAKAMATSU[2]，TOSHIAKI MITSUI[1,2]（[1]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Niigata University, [2]Graduate School of Science and Technology, Niigata University）

## J33 会場　午前の部（9:20〜12:00）

酵素―糖質代謝関連酵素―

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**3J33a01　*Trichoderma reesei* 由来 Cel1A の糖転移生成物のセルラーゼ誘導活性**
**9:20**　◦戸谷一英[1]，　佐野孝晃[1]，　二階堂望[1]，　中島将博[2]，中井博之[3]，中澤　光[4]（[1]一関高専・物化工，[2]東理大院・理工，[3]新潟大・農，[4]東北大院・工）

**3J33a02　貝類由来セルラーゼ EG27II の X 線結晶構造解析および機能解析**
**9:35**　◦野村泰介[1]，　水谷公彦[2]，　岩瀬久夢[2]，　高橋延行[2]，三上文三[2]（[1]京大農，[2]京大院農）

**3J33a03　*Paenibacillus* 属細菌由来細胞表層キチナーゼ ChiW の立体構造**
**9:50**　◦伊藤貴文[1]，日ビ隆雄[1]，藤井　豊[2]，武藤　明[3]，木元　久[1]（[1]福井県大・生物資源，[2]福井大・医，[3]福井工大・工）

**3J33a04　細菌 *Chitiniphilus shinanonensis* のキチン代謝における *β*-N-acetylglucosaminidase の役割について**
**10:05**　◦小松　茜，佐藤弘晃，田口悟朗，野川優洋，下坂　誠（信州大繊維）

**3J33a05　*Stenotrophomonas maltophilia* NYT501 の糖転移型**
**10:20**　◦宮　弘昂[1]，高橋愛実[1]，平野貴子[2]，袴田　航[1,2]，西尾俊幸[1,2]（[1]日大院生資科，[2]日大生資科）

**a06〜a10 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**3J33a06　*Bacillus* sp. CH11 株 N-アセチルヘキソサミニダーゼの酵素的性質**
**10:45**　◦倉掛昌裕，天井裕可里，小西瑞希，池平佳歩（福山大生命工）

**3J33a07　*Streptomyces griseus* 由来の LPMO10 の解析**
**11:00**　◦中川裕子[1]，　渡辺惣汰[1]，　石川隆大[1]，　Loose S. M. Jennifer[2]，竹林　晃[1]，加藤早紀[3]，森　俊明[3]，戸谷一英[1]，Vaaje-Kolstad Gustav[2]，Eijsink G. H. Vincent[2]（[1]一関高専 物化工，[2]Norwegian Univ. of life sci.，[3]東工大院 生命理工）

**3J33a08　*Streptomyces griseus* 由来 LPMOs，*Sg* LPMO10A の機能解析**
**11:15**　◦里　和希[1]，千葉大介[2]，戸谷一英[1]，中川裕子[1]（[1]一関高専　物化工，[2]北大　環境科学）

**3J33a09　ボルボックスキチナーゼがもつ 2 つの LysM ドメインの構造と機能**
**11:30**　◦北奥喜仁[1,2]，　廣野　武[1]，　西村重徳[3]，　沼田倫征[4]，深溝　慶[1]，大沼貴之[1]（[1]近畿大学，[2]日本学術振興会特別研究員，[3]大阪府立大学，[4]産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門）

**3J33a10　新規な一次構造をもつキチナーゼの同定**
**11:45**　◦金井　保[1,2]，堀内あゆみ[1]，ASLAM Mehwish[1]，跡見晴幸[1,2]（[1]京大工，[2]CREST, JST）

## J33 会場　午後の部（14:00〜18:20）

酵素―糖質代謝関連酵素，脂質代謝関連酵素―

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**3J33p01　Functional expression and characterization of fungal glucuronoyl esterases**
**14:00**　◦HiepHung Huynh，Manabu Arioka（Dept. of Biotech., The Univ. of Tokyo）

**3J33p02　Heterologous expression and characterization of GH26 beta-mannanases from a symbiotic protist community**

**of the termite *Reticulitermes speratus***

**14:15** ○Yunhan HSU[1], Hirohiko Koizumi[1], Masato Otagiri[2], Shigeharu Moriya[2,3], Manabu Arioka[1] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]RIKEN Center for Sustainable Resource Science, [3]Bioanalytical Sciences Laboratory, Graduate School of Yokohama City University)

**3J33p03 *Aspergillus kawachii* 由来 β-フルクトフラノシダーゼとフルクトースとの複合体の X 線結晶構造解析**

**14:30** ○長屋美香[1], 木村美代子[1], 佐藤祥名[1], 平野勝紹[2], 栃尾 巧[2], 西河 淳[1], 殿塚隆史[1] ([1]東京農工大院農, [2]物産フードサイエンス研究開発セ)

**3J33p04 麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来イソプリメベロース生成酵素の機能と構造**

**14:45** ○矢追克郎[1], 松沢智彦[1], 渡邊真宏[2] ([1]産総研生物プロセス, [2]産総研機能化学)

**3J33p05 マンゴー由来 α 1,3/α 1,4 フコース転移酵素遺伝子(MiFUT13)の同定・機能解析**

**15:00** ○岡田貴裕, 池田義孝 (佐大医)

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**3J33p06 *Shinella* sp. NN-6 株由来の L-ラムノースイソメラーゼの諸性質の検討および希少糖生産**

**15:25** ○後藤成暁[1], 十川直也[1], 千葉和也[1], 森本兼司[2] ([1]香大農, [2]香大国際希少糖研究教育機構)

**3J33p07 アルドース-ケトース間の異性化反応を利用したセロビオース 2-エピメラーゼの反応機構の解析**

**15:40** ○佐分利亘[1], 武藤洋彦[1], 藤原孝彰[2], 加藤公児[2], 姚 閔[2], 森 春英[1] ([1]北大院農, [2]北大院生命)

**3J33p08 *Arthrobacter globiformis* M30 由来 xylitol oxidase の精製と希少アルドース生産**

**15:55** ○熊谷拓也[1], 吉原明秀[1,2], 大谷耕平[3], 秋光和也[1,2], 何森 健[1,2] ([1]香川大農, [2]香川大・国際希少糖研究教育, [3]松谷化学)

**3J33p09 希少糖生産酵素 *Arthrobacter* 属由来 D-アルロース 3-エピメラーゼの基質複合体構造解析**

**16:10** ○吉田裕美[1,3], 吉原明秀[2,3], Pushpa Kiran Gullapalli[4], 大谷耕平[4], 秋光和也[2,3], 何森 健[2,3], 神鳥成弘[1,3] ([1]香川大総合生命研究セ, [2]香川大農, [3]香川大国際希少糖研究教育, [4]松谷化学)

**3J33p10 メタゲノム由来 α-キシロシダーゼの単離と機能解析**

**16:25** ○松沢智彦, 木村信忠, 末永 光, 矢追克郎 (産総研・生物プロセス)

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**3J33p11 *Paenibacillus agaridevorans* 由来 β-アガラーゼの精製とその諸性質**

**16:50** ○田村絵梨子[1], 和田夏実[2], 稲村俊秀[2], 舟根和美[3], 一ノ瀬仁美[1,2,4] ([1]信州大院, [2]信州大農, [3]農研機構食総研, [4]信州大菌類・微生物ダイナミズム創発研究センター)

**3J33p12 酵母 split-ubiquitin システムを利用したヒト MPDU1 蛋白質に関する物理的相互作用の解析**

**17:05** ○高橋哲夫, 傅能康成, 岩本栄介, 田中智恵美 (東海大工)

**3J33p13 Interaction between proteins involved in the biosynthesis of EPA-containing phospholipids in a psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10**

**17:20** ○Tsai-min CHEN, Ryutaro OGURA, Takuya OGAWA, Jun KAWAMOTO, Tatsuo KURIHARA (Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.)

**3J33p14 低温性 *Shewanella* 属細菌由来リゾホスファチジン酸アシル基転移酵素 PlsC の機能解析**

**17:35** ○田中麻子, 小川拓哉, 川本 純, 栗原達夫 (京大化研)

**3J33p15 低温性 *Shewanella* 属細菌の色素生産に関与するリゾホスファチジン酸アシル基転移酵素ホモログの機能解析**

**17:50** ○小川拓哉, 太田昌希, 川本 純, 栗原達夫 (京大化研)

**3J33p16 必須脂肪酸欠乏における Elovl5 のリン酸化を介した活性制御機構の解明**

**18:05** ○林 優里[1], 市 育代[2,3], 山野美怜[1], 藤原葉子[2,3] ([1]お茶大院・ライフ, [2]お茶大・基幹研究院, [3]お茶大・HLI 研)

## J34 会場 午前の部 (9:20〜11:45)

酵素—タンパク質・ペプチド代謝関連酵素—

**a01〜a05 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**3J34a01 *Pimelobacter* sp. Z-483 株由来メタロプロテアーゼ遺伝子のクローニングと発現**

**9:20** ○大橋大志[1], 浴野圭輔[2], 尾山 廣[1] ([1]摂南大理工, [2]崇城大生物生命)

**3J34a02 カルパイン 3 の自己分解と活性化について**

**9:35** ○小野弥子, 土井奈穂子, 反町洋之 (東京都医学研)

**3J34a03 カルパインの特性を規定する基質特異性の定量的構造-活性相関解析**

**9:50** ○大内史子[1], 小山 傑[1,2], 進藤真由美[3], 馬見塚拓[4], 瀧川一学[5], 尾嶋孝一[6], 秦 勝志[1], 小野弥子[1], 反町洋之[1] ([1]都医学研・カルパイン, [2]旭化成ファーマ医薬研究センター, [3]都医学研・基盤技術研究センター, [4]京大・化研, [5]北大院・情報科学, [6]農研機構・畜産研)

**3J34a04 放線菌由来アミノペプチダーゼによるペプチド分解評価系**

**10:05** ○畑中唯史, 裏地美杉, 万 クン (岡山生物研)

**3J34a05 放線菌由来アミノペプチダーゼによるアレルゲンペプチドの分解**

**10:20** ○万 クン, 裏地美杉, 畑中唯史 (岡山県生物科学研究所)

**a06〜a09 発表者の接続時間 10:35〜10:45**

**3J34a06 *Hypsizygus marmoreus* 由来アミノペプチダーゼに関する研究**

**10:45** ○大庭将矢, 福田泰久, 白坂憲章 (近大農)

**3J34a07 蛍光性ペプチドを用いたホスホリラーゼキナーゼの高感度活性測定**

**11:00** ○古郷 楽, 牧野泰士, 佐藤正明 (大阪府立大学)

**3J34a08 γ-グルタミル化によるタンパク加水分解物の苦味低減とコク味の付与**

**11:15** ○中藤裕子, 田村友規, 鈴木秀之 (京都工繊大応生)

**3J34a09 好熱好酸性アーキア *Sulfolobus tokodaii* に存在する 2 種類の色素依存性 D-乳酸脱水素酵素の機能解析**

**11:30** ○里村武範[1,2], 角間真人[1], 黒沢則夫[5], 櫻庭春彦[3], 大島敏久[4], 末信一朗[1,2] ([1]福井大院工, [2]福井大ライフ, [3]香川大農, [4]大阪工大工, [5]創価大)

## J34 会場 午後の部 (14:00〜18:20)

酵素—アミノ酸代謝関連酵素—

**p01〜p05 発表者の接続時間 13:50〜14:00**

**3J34p01 L-メチオニン脱炭酸酵素を用いた新規 L-メチオニン定量法の開発**

**14:00** ○林 将也[1], 根本理子[1], 稲垣純子[2], 菊池可菜子[3], 木村 隆[3], 田村 隆[1], 稲垣賢二[1] ([1]岡山大院・環境生命, [2]岡山大院・医歯薬, [3]ニプロ㈱・酵素センター)

**3J34p02 糸状菌由来の抗腫瘍性酵素 L-リシン α-オキシダーゼの大腸菌発現・精製系の構築**

**14:15** ○松本侑也[1], 天野万里[1], 根本理子[1], 稲垣純子[2], 田村 隆[1], 日下部均[3], 稲垣賢二[1] ([1]岡山大院・環境生命, [2]岡山大院・医歯薬, [3]㈱エンザイム・センサ)

**3J34p03 Transcriptomic analysis of cordycepin biosynthesis pathway between in liquid surface culture and submerges culture using *Cordyceps militaris***

**14:30** ○Suparmin Ahmad[1], Tatsuya Kato[1,2], Hideo Dora[3], Enoch Y. Park[1,2] ([1]Fac. Agric., Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., [3]Ins. Res. Support Office Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

**3J34p04 タンパク質一次構造に基づく新たなインシリコ酵素探索法, INTMSAlign_Angler の開発**

**14:45** ○中野祥吾[1,3], 本山智晴[1], 篠田 優[2,3], 伊藤創平[1,3], 浅野泰久[2,3] ([1]静岡県大・食栄, [2]富山県大工・生工研セ, [3]JST, ERATO)

**3J34p05 人工設計型配列データベース由来 L-スレオニン脱水素酵素の機能解析**

**15:00** ○本山智晴[1], 中野祥吾[1,3], 松永玲実[1], 浅野泰久[2,3], 伊藤創平[1,3] ([1]静岡県大・食栄, [2]富山県大工・生工研セ, [3]JST, ERATO)

**p06〜p10 発表者の接続時間 15:15〜15:25**

**3J34p06 超好熱性細菌 *Thermotoga maritima* 由来アスパラギン酸キナーゼ / ホモセリンデヒドロゲナーゼ融合酵素(AK/HseDH)の機能解析**

**15:25** ○古場康平[1], 林 順司[1], 安部展洋[1], 米田一成[2], 大島敏久[3], 櫻庭春彦[1] ([1]香川大農, [2]東海大農, [3]大工大工)

**3J34p07 糸状菌 Z26-4-8 株が産生するタンパク質酸化能を有するアミノ酸オキシダーゼの諸性質解明**

**15:40** ○土屋高伸, 山田美和, 下飯 仁, 礒部公安 (岩大農)

**3J34p08 ヒト腸内細菌優占種の芳香族アミン生成能および大腸菌を用いた異種発現による芳香族アミノ酸脱炭酸酵素(AADC)ホモログの性状解明**

**15:55** ○河田明輝[1], 杉山友太[2], 奈良未沙希[2], 小柳 喬[1], 片山高嶺[2,3], 栗原 新[2] ([1]石川県大・生資環・食品, [2]石川県大・腸内細菌, [3]京大院・生命)

**3J34p09 好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来のリジン生合成系酵素 LysK とキャリアタンパク質 LysW の相互作用機構に関する研究**

**16:10** ○藤田理美, 長谷部文人, CHO Su-Hee, 富田武郎, 葛山智久, 西山 真 (東大・生物工学セ)

**3J34p10 Sphingobium sp. SYK-6 株の O-demethylase LigM の研究**

**16:25** ○于 宏洋[1,2], 原田彩佳[2], 上村直史[3], 政井英司[3], 千田俊哉[1,2] ([1]総研大, [2]高エネ機構 構造生物, [3]長岡技大)

**p11〜p16 発表者の接続時間 16:40〜16:50**

**3J34p11 好冷好圧性細菌 Shewanella violacea DSS12 由来のアラニンラセマーゼの性質**

**16:50** ○板橋慶亮[1], 寶田恵里花[1], 德久真弓[1], 谷川 実[1], 西村克史[1], 加藤千明[2] ([1]日大理工, [2]海洋研究開発機構)

**3J34p12 哺乳類 L-セリンデヒドラターゼの酵素学的性質の解析と応用利用**

**17:05** ○武藤菜摘, 伊藤智和, 邊見 久, 吉村 徹 (名大院生命農)

**3J34p13 ブナシメジに存在する新奇 D-アミノ酸の同定**

**17:20** ○伊藤智和[1], 余 卓尔[1], 吉野一晴[2], 渡邉 彰[2], 邊見 久[1], 麻田恭彦[2], 吉村 徹[1] ([1]名大院･生命農, [2]香川大･農)

**3J34p14 好酸性鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* における D-アミノ酸の影響と D-アミノ酸脱水素酵素の性質**

**17:35** ○鈴木里菜[1], 朝隈紗月[1], 上原汐織[1], 德久真弓[1], 谷川 実[1], 西村克史[1,2] ([1]日本大学, [2]日本大学短期大学部)

**3J34p15 *Pseudomonas putida* の D-リジン異化代謝オペロンの転写制御機構**

**17:50** ○佐藤大起, 近藤和貴, 戸部隆太, 三原久明 (立命館大生命)

**3J34p16 グラム陽性菌 *Clostridium sticklandii* 由来 D-セレノシスチン *α, β*-リアーゼの機能解析**

**18:05** ○中尾領太, 片浦美沙, 戸部隆太, 三原久明 (立命大生命)

講演番号
開始時間　　演　　題　　発表者氏名（所属）

## A01 会場　午前の部（9:35〜12:00）

動物―個体－生理・栄養・代謝，生体機能，生体制御―

**a02〜a06 発表者の接続時間 9:25〜9:35**

**4A01a02　アミノ酸トランスポーター LAT3,4 の発現制御解析**
**9:35** ◦眞鍋瑞歩[1]，　橋詰　力[2]，　清水　誠[1]，　井上　順[1]，佐藤隆一郎[1]（[1]東大院農，[2]東大高齢社会総合研究機構）

**4A01a03　線虫のカルシニューリンが関与する寿命制御機構の解析**
**9:50** ◦近藤春佳，久米一規，水沼正樹（広島大・院先端研・分子生命）

**4A01a04　4 系統ヘテロ雌マウスは老齢期まで妊孕性が維持される**
**10:05** ◦小澤裕介[1]，　渡辺憲史[1]，　戸田年彦[1]，　奥村暢章[1]，河村和弘[2]，清水孝彦[1]（[1]千葉大学 先進加齢医学，[2]聖マリアンナ医科大学 産婦人科）

**4A01a05　海棲ほ乳類（ラッコ）の味覚受容体遺伝子の分子生物学的解析**
**10:20** ◦海老原充[1]，若井嘉人[2]，中野千里[2]，大島　結[1]（[1]石川県大食品，[2]鳥羽水族館）

**4A01a06　ショウジョウバエ新規オクトパミン受容体 DmOA3 の機能解析**
**10:35** ◦前原志穂里[1]，　中川寛之[2]，　冨田　淳[2]，　粂　和彦[2]，太田広人[1]（[1]熊大院・先端科学，[2]名市大院・薬学）

**a07〜a10 発表者の接続時間 10:50〜11:00**

**4A01a07　*Ce*-AKH-GnRH 合成ペプチドが線虫 *Caenorhabditis elegans* の産卵過程促進に寄与するか否かの検討**
**11:00** ◦齋藤雪子，塚越紀子，片山秀和，笹川　昇（東海大）

**4A01a08　リゾチームプロモーターを用いた卵白特異的ヒトエリスロポエチン生産**
**11:15** ◦森脇脩一郎，　小島佑介，　奥嵜雄也，　淺井聖也，土田将大，金岡英徳，西島謙一，飯島信司（名大院工）

**4A01a09　サブトラクション PCR 法を用いたホタルイカルシフェラーゼ候補 cDNA のクローニング**
**11:30** ◦石田裕幸[1,2]，浅野泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ，[2]JST, ERATO）

**4A01a10　ゲノム編集法を用いた choline 産生酵素 GDE5 の欠損細胞，および欠損マウスの作製とその形質の解析**
**11:45** ◦中村美奈子[1]，　佐久間哲史[2]，　星野由美[1]，　中山　航[3]，中川佳子[4]，　竹尾　透[4]，　中潟直己[4]，　加藤範久[1]，　島田昌之[1]，山本　卓[2]，矢中規之[1]（[1]広島大院・生物圏，[2]広島大院・理，[3]広島大・生物生産，[4]熊本大・CARD）

## A02 会場　午前の部（9:20〜12:30）

動物―その他―

**a01〜a06 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**4A02a01　創傷治癒における脂肪組織由来間質細胞と炎症細胞との相互作用**
**9:20** ◦服部秀美[1]，石原雅之[2]（[1]宮崎大農，[2]防衛医大研究センター）

**4A02a02　ミズクラゲのストロビレーションに伴って発現増加するリソソーム加水分解酵素遺伝子群の解析**
**9:35** ◦辻田菜摘[1]，　小山寛喜[1]，　辻　敏之[2]，　矢中規之[1]，荒川賢治[3]，国吉久人[1]（[1]広島大院・生物圏，[2]長浜バイオ大・バイオサイエンス，[3]広島大院・先端研）

**4A02a03　大腸癌細胞にアノイキスを誘導する酸化コレステロールのメカニズム解析**
**9:50** ◦田中亜路[1]，守冨早織[1]，齋藤瞭子[1]，上原至雅[2]（[1]安田女子家政，[2]岩手医薬）

**4A02a04　カイコガ雄性生殖器原基の発達におけるホルモン調節機構**
**10:05** ◦藤永大輝[1]，片岡宏誌[1]，溝口　明[2]（[1]東大院・新領域・先端生命科学，[2]愛知学院大・教養）

**4A02a05　近赤外生物発光材料の生体内イメージングにおける有用性**
**10:20** ◦北田昇雄[1]，　木山正啓[1]，　齊藤亮平[1]，　岩野　智[2]，丹羽治樹[1]，平野　誉[1]，牧昌次郎[1]（[1]電気通信大学，[2]理研）

**4A02a06　*Bactrocera* 属ミバエの化学感覚受容体の同定と発現組織の解析**
**10:35** ◦宮崎仁実，大竹　潤，吉永直子，森　直樹，西田律夫，小野　肇（京大院農）

**a07〜a12 発表者の接続時間 10:50〜11:00**

**4A02a07　カイコ（*Bombyx mori*）幼虫における摂食行動制御因子アラトトロピン及び GSRYamide の機能解析**
**11:00** ◦松本澄洋，永田晋治（東大院・新領域・先端生命科学）

**4A02a08　Effects of Crustacean Cardioactive peptide（CCAP）on feeding behavior in the two-spotted crickets, *Gryllus bimaclatus***
**11:15** ◦Yijun ZHOU，Shinji NAGATA（Grad. Sch. of Fro. Sci., the Univ. of Tokyo）

**4A02a09　フタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* における卵巣摘出による摂食行動変化と脂肪体の転写変動解析**
**11:30** ◦塚本悠介，永田晋治（東大院・新領域・先端生命科学）

**4A02a10　フタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* における異なる脂肪酸間での経時的な選好性行動解析**
**11:45** ◦福村圭介，永田晋治（東大院・新領域・先端生命科学）

**4A02a11　フタホシコオロギの捕食行動における異種個体の認識**
**12:00** ◦吉國大稀，森山　俊，永田普治(東大)

**4A02a12　ABCA1 依存的 HDL 形成におけるステロール分子特異性と膜ドメイン**
**12:15** ◦山内祥生[1]，横山信治[2]，CHANG Ta-Yuan[3]（[1]東大農，[2]中部大応生，[3]ダートマス大医）

## A03 会場　午前の部（9:20〜12:30）

食品―食品化学－色素，香料―

**a01〜a06 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**4A03a01　カテキン類の化学酸化反応を活用した簡便な新染毛法**
**9:20** ◦櫻井千寛，渡邊克樹，松原孝典（産業技術短期大学）

**4A03a02　ポリフェノール類の酸化反応を用いた絹の新染色法**
**9:35** ◦岡田魁斗，松原孝典（産業技術短期大学）

**4A03a03　テアフラビン類によるリン脂質リポソームの不溶化と胆汁酸による再分散**
**9:50** ◦中山　勉，猿渡晃介，森　名丘，奈良井朝子（日獣大 応生科）

**4A03a04　香気成分・Zerumbone 類縁体の Baeyer-Villiger 酸化**
**10:05** ◦芦田久美子，北山　隆（近畿大院・農・バイオ）

**4A03a05　SanCat$^{R}$によるキラルな香料素材の調製**
**10:20** ◦松尾弘武[1]，大塚舜人[1]，永岡宏行[2]，赤壁善彦[1]（[1]山口大学大学院 創成科学研究科，[2]サンヨー食品(株)）

**4A03a06　ダイズ加工時に 1-Octen-3-ol は配糖体加水分解で生成される**
**10:35** ◦松井健二[1]，肥塚崇男[1]，竹本裕之[2]，大西利幸[3]（[1]山口大院創成科学，[2]静岡大グリーン研，[3]静岡大農）

**a07〜a12 発表者の接続時間 10:50〜11:00**

**4A03a07　レモン系低アルコール果汁飲料への果汁感付与に関わる香気成分の探索**
**11:00** ◦瀬川　睦，　水谷浩平，　鈴木たまみ，　和田華奈子，西塚太一（アサヒビール）

**4A03a08　無合成農薬リンゴにおける香気プロファイルの経年変化および品種間差異**
**11:15**　○田中福代[1]，立木美保[2]，岡崎圭毅[1]，伊藤　伝[2]（[1]農研機構 中央農研，[2]農研機構 果樹茶部門）

**4A03a09　バニラ香およびオレンジ香による塩味増強**
**11:30**　○河合崇行[1]，日下部裕子[1]，後藤猛仁[2]（[1]農研機構 食品研究部門，[2]山形県 工技セ）

**4A03a10　AROMATCH® を用いたバニラの香調プロファイリング**
**11:45**　○末田麗華，葛西賢造，高垣仁志（曽田香料株式会社）

**4A03a11　リアルタイム香気分析装置を利用した「喉越し感」に寄与する香りバランス変化に関する考察**
**12:00**　○伊藤慎一郎，大森　憲，宮崎秀基，武田寿弘，星野邦秀（高砂香料工業株式会社 研究開発本部）

**4A03a12　Temporal Dominance of Sensations（TDS）法と機器分析を用いたグミ咀嚼中のレトロネーザルアロマリリースの評価**
**12:15**　○大森雄一郎，　藤木文乃，　明賀博樹，　小林恵美，前田知子，中村哲也，斉藤　司（長谷川香料株式会社 総合研究所）

## A04 会場　午前の部（9:20〜12:30）

食品―食品機能・栄養－糖質代謝―

**a01〜a06 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**4A04a01　子宮内高血糖環境が胎児心筋細胞に与える影響**
**9:20**　○中村彰男[1]，野口礼於奈[2]，河原田律子[2]　（[1]群馬大 院医，[2]高健大 栄養）

**4A04a02　カカオポリフェノールによるエネルギー代謝促進効果：投与タイミングと時計遺伝子発現**
**9:35**　○光橋雄史，山下陽子，芦田　均（神戸大院農）

**4A04a03　膵 β 細胞における *S*- エクオールの cAMP 産生作用には GPCR が関与する**
**9:50**　○堀内寛子[1]，原田直樹[1]，乾　博[2]，山地亮一[1]（[1]大阪府大・生命環境，[2]大阪府大・栄養）

**4A04a04　キャノロールの糖・脂質代謝改善作用及びそのメカニズムに関する研究**
**10:05**　○崔　楠[1]，蓮野裕貴[1]，山室美由紀[1]，高橋麻子[1]，平井　静[1]，根崎裕子[2]，山田浩司[2]，弥武経也[2]，河本高伸[2]，江頭祐嘉合[1]（[1]千葉大院・園芸・応生化，[2]昭和産業(株)）

**4A04a05　糖尿病モデルマウスにおけるイチゴポリフェノールの抗糖尿病作用**
**10:20**　○近藤真司[1]，安達真一[1]，吉澤史昭[2,3]，矢ヶ崎一三[1]（[1]宇都宮大・バイオセ，[2]宇都宮大・農，[3]農工大院・連農）

**4A04a06　PPARalpha アゴニストは FGF21 の脂肪組織に対する作用の亢進を介して糖質代謝異常を改善する**
**10:35**　○後藤　剛[1,2]，平田茉莉子[1]，青木ゆめこ[1]，高橋春弥[1]，Kim Minji[1]，Jheng Huei-Fen[1]，野村　亘[1,2]，高橋信之[1,2]，河田照雄[1,2]（[1]京大院農・食品生物，[2]京大・生理化学研究ユニット）

**a07〜a12 発表者の接続時間 10:50〜11:00**

**4A04a07　アミロマルターゼとブランチングエンザイムを利用した緩やかな消化性と高い消化性の両方の特徴を持つ高分子デキストリンの合成**
**11:00**　○渡邊浩史，寺田喜信，柳瀬美千代，鷹羽武史，栗木　隆（江崎グリコ株式会社）

**4A04a08　アーモンドの血糖値上昇抑制効果**
**11:15**　○加藤和子，Vo Phuong，古屋敷隆，釜阪　寛，栗木　隆（江崎グリコ(株)健康科学研究所）

**4A04a09　シナモン熱水抽出物はインスリンシグナルを介してグルコース取り込みを促進する**
**11:30**　○チンセイセン[1]，青田彩花[2]，島村真保子[2]，増澤（尾崎）依[1,2]，細野　崇[1,2]，松藤　寛[3]，関泰一郎[1,2]（[1]日大院・生資科・応生科，[2]日大・生資科・生命化，[3]日大・生資科・食生）

**4A04a10　骨格筋において糖取り込みを促進させる EGCg の標的分子探索**
**11:45**　○池田真規，芦田　均（神大農）

**4A04a11　マウス摘出腸管機能に及ぼすキャベツ酢等の影響**
**12:00**　○寺島和哉[1]，石原　智[2]，本間知夫[1]（[1]前工大院，[2]群馬県農技センター）

**4A04a12　1-ケストースのプレバイオティクス効果**
**12:15**　○高橋基毅[1]，　神尾里奈[1]，　栃尾　巧[2]，　遠藤章人[3]，北浦靖之[1]，下村吉治[1]（[1]名大農，[2](株)物産フードサイエンス 研究開発センター，[3]東農大 生物生産）

## A05 会場　午前の部（9:20〜12:00）

食品―食品機能・栄養－ビタミン・ミネラル―

**a01〜a06 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**4A05a01　高リン・高マグネシウム食が骨形成ミネラルの出納およびマウス大腿骨の骨密度に与える影響**
**9:20**　○田口陽介，中谷祥恵，和田政裕，古旗賢二（城西大院･薬）

**4A05a02　カルシウムの取りすぎは，記憶能力を低下させる**
**9:35**　○井上達郎，冨士達矢，長谷川靖（室工大院）

**4A05a03　温州ミカン β-クリプトキサンチン含有量の貯蔵期間中の推移**
**9:50**　○新居美香，梯　美仁（徳農技セ）

**4A05a04　養液栽培法によるホウレンソウの機能性向上**
**10:05**　○渡辺　祥[1]，　立上陽平[1]，　大谷優太[1]，　青木　航[1,3]，雨宮　崇[2]，助清泰教[2]，窪川清一[2]，植田充美[1,3]（[1]京大院・農・応用生命，[2]三菱樹脂株式会社，[3]京都産業科学技術総合イノベーションセンター）

**4A05a05　ピロロキノリンキノンとイミダゾロピロロキノリンの神経系細胞への効果の比較検討**
**10:20**　○西居和哉，中路昌志，中西　慧，山田康枝（近畿大工）

**4A05a06　ビタミン K が海馬におけるステロイド産生に及ぼす影響**
**10:35**　○岡田菜緒，白川　仁，何　欣蓉，後藤知子，駒井三千夫（東北大・院農・栄養学）

**a07〜a10 発表者の接続時間 10:50〜11:00**

**4A05a07　ビタミン欠乏が卵母細胞の質におよぼす影響**
**11:00**　○辻　愛[1]，中村肇伸[2]，柴田克己[3]（[1]神戸学院大栄養，[2]長浜バイオ大アニマルバイオ，[3]滋賀県大生活栄養）

**4A05a08　没食子酸がビタミン C トランスポーター SVCT1（SLC23A1）を介したビタミン C 取り込みに与える影響**
**11:15**　○池島俊季，　荒川　充，　石川亜紀子，　山口実希子，佐藤由香沙，太刀川晃生（ディーエイチシー）

**4A05a09　培養ミクログリア細胞におけるビタミン K2 の抗炎症効果**
**11:30**　○青山奈央，白川　仁，後藤知子，駒井三千夫（東北大・院農・栄養学）

**4A05a10　ラット反転腸におけるアスコルビン酸吸収に及ぼすリンゴ果汁の効果**
**11:45**　○井澤弘美，石戸谷春花，佐々木貴和子（青森県立保健大学栄養）

## A06 会場　午前の部（9:20〜12:30）

食品―食品工学－加工学―

**a01〜a06 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**4A06a01　マヨネーズの粘度におよぼす乳化時の pH の影響**
**9:20**　○下山田真[1]，　神田絢美[1]，　増田勇人[1]，　石川愛子[2]，餅田浩基[2]（[1]静岡県大，[2](株)鈴与総研）

**4A06a02　脂肪球が乳タンパク質による泡沫の安定性に及ぼす影響**
**9:35**　○大野智未[1]，　松宮健太郎[1]，　小杉達也[2]，　久保内宏晶[2]，松村康生[1]（[1]京大院農，[2]雪印メグミルク(株)）

**4A06a03　ギス肉加熱ゲルにおける戻りとミオシン重鎖の分解動態について**
**9:50**　○中溝量子[1]，　小南友里[1]，　三根健太郎[1]，　中谷操子[1]，岡田　茂[1]，　松岡洋子[2]，　植木暢彦[2]，　万　建栄[2]，　渡部終五[3]，

潮　秀樹[1]（[1]東大院農，[2]鈴廣魚肉たんぱく研，[3]北里大）

**4A06a04　ブランド豚肉 TOKYO X と *Lactobacillus* 属乳酸菌を用いて製造した発酵ソーセージの熟成経過と品質**

**10:05**　◦磯野未来，三枝弘育，西木秀人，竹友直生，細井知弘，三枝静江（東京都立食技セ）

**4A06a05　ゴボウの硬さに関与する多糖類中のアラビノースついて**

**10:20**　◦井上竜一（(公財)東洋食品研究所）

**4A06a06　微生物を用いた食物繊維の高純度化**

**10:35**　◦梅村征一郎[1]，　平井宏和[1]，　濱口徳寿[1]，　吉田信行[2]，木村　亨[1]（[1]日本食品化工(株)，[2]静大院工）

**a07〜a12 発表者の接続時間 10:50〜11:00**

**4A06a07　高温で無水糖を分解可能な微生物の検索**

**11:00**　◦岩崎慎太郎[1]，吉田信行[1]，平井宏和[2]，濱口徳寿[2]（[1]静大院，[2]日本食品化工）

**4A06a08　Evaluation of antioxidant and cytoprotective activities of immature fruit extracts obtained by solvent-free extraction methods**

**11:15**　◦Ming Yuan Heng[1]，Shigeru Katayama[1]，Takakazu Mitani[2]，Eng Shi Ong[3]，Soichiro Nakamura[1]（[1]Shinshu Univ.，[2]Shinshu Univ. ICCER，[3]Singapore University of Technology and Design）

**4A06a09　脱気中温中高圧処理によるパイナップルコンポートの製造条件最適化**

**11:30**　◦山本和貴[1]，UDDIN Nazim[1,2,3]，中浦嘉子[1]（[1]農研機構食品部門，[2]BARI，[3]国連大学）

**4A06a10　Influence of extraction and solubilizing treatments on the molecular structure and functional properties of peanut protein**

**11:45**　◦TIEZHENG MA，　HONGGUANG ZHU，　JING WANG（Beijing Technol. & Bus. Univ.）

**4A06a11　含塩亜臨界水中における単糖の分解の速度解析**

**12:00**　◦小林　敬，安達修二（京大院農）

**4A06a12　n-3PUFA の探索：黒石茶等数種植物の α-リノレン酸**

**12:15**　◦齋藤洋昭，平出　郁（石川県立大学）

## A07 会場　午前の部（9:20〜12:30）

食品―食品機能・栄養－その他―

**a01〜a06 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**4A07a01　食用ヘチマエキスの経口摂取によるドライスキン改善作用の検討**

**9:20**　◦伊藤良一，織谷幸太，野中詩織，山本貴之，柳江高次，斎　政彦（森永製菓(株)）

**4A07a02　食用ヘチマエキス中のフェノール性化合物の単離・構造決定**

**9:35**　◦梅原将洋，柳江高次，山本貴之，野中詩織，齋　政彦（森永製菓(株)）

**4A07a03　食用ヘチマエキス摂取時のラットにおける *p*-クマル酸の吸収**

**9:50**　◦瀬戸口裕子，織谷幸太，伊藤良一，梅原将洋，山本貴之，柳江高次，齋　政彦（森永製菓(株)）

**4A07a04　食用ヘチマエキスの有効成分 *p*-クマル酸が細胞の水分透過性に与える影響**

**10:05**　◦野中詩織，山本貴之，梅原将洋，柳江高次，齋　政彦（森永製菓(株)）

**4A07a05　食用ヘチマエキスの有効成分 *p*-クマル酸および *p*-クマル酸配糖体の安定性**

**10:20**　◦柳江高次，瀬戸口裕子，梅原将洋，織谷幸太，齋　政彦（森永製菓株式会社）

**4A07a06　アロエステロール経口摂取によるヒト皮膚機能に及ぼす影響**

**10:35**　◦鍋島かずみ[1]，田中美順[1]，三澤江里子[1]，齊藤万里江[1]，山内恒治[1]，阿部文明[1]，山本有紀[2]，古川福実[2]（[1]森永乳業・素材応用研究所，[2]和歌山県立医科大・皮膚科）

**a07〜a12 発表者の接続時間 10:50〜11:00**

**4A07a07　青梅を利用した化粧水の美白効果と有効成分の分析**

**11:00**　◦本間知夫[1]，　深澤穂乃美[1]，　鈴木真依[1]，　望月愛華[1]，金井裕美[1]，地下まゆみ[2]（[1]前工大生物工学，[2]大阪大谷大教育）

**4A07a08　卵黄由来ヒアルロン酸産生促進物質（iHA）の肌機能に対する効果**

**11:15**　◦井上侑紀，中村紀夫，堀江健二，黄　英晴，金　武祚（(株)ファーマフーズ）

**4A07a09　鶏足由来ヒアルロン酸産生促進物質の経口摂取による膝痛改善効果**

**11:30**　◦山下裕輔，中村紀夫，堀江健二，金　武祚（(株)ファーマフーズ）

**4A07a10　女性を対象とした卵黄由来育毛素材の経口摂取試験**

**11:45**　◦中村紀夫[1]，　山村春男[2]，　堀江典子[1]，　堀江健二[1]，金　武祚[1]，板見　智[3]（[1](株)ファーマフーズ，[2](株)シャルレ，[3]大阪大学大学院医学系研究科　皮膚・毛髪再生医学寄附講座）

**4A07a11　タマネギ由来エクソソーム様ナノ粒子の基礎的分析**

**12:00**　◦古庄利菜[1]，　山崎水優[1]，　高島沙季[1]，　花本由輝[1]，園田紘子[2]，　池田正浩[2]，　亀井一郎[3]，　大島達也[4]，　山崎有美[5]，西山和夫[1]，山崎正夫[1]（[1]宮大・農・応生，[2]宮大・農・獣医，[3]宮大・農・森林，[4]宮大・工・環境応用，[5]宮大・地域）

**4A07a12　食用植物由来エクソソーム様ナノ粒子のヒト乳がん抑制作用**

**12:15**　◦山崎有美[1]，　亀井一郎[2]，　大島達也[3]，　池田正浩[4]，園田紘子[4]，山崎正夫[5]（[1]宮大地域，[2]宮大農・森林，[3]宮大工・環境応用，[4]宮大農・獣医，[5]宮大農・応生）

## A08 会場　午前の部（9:20〜12:30）

食品―食品機能・栄養－メタボリック・シンドローム，エネルギー代謝―

**a01〜a06 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**4A08a01　クルクミンによる褐色脂肪細胞化の誘導とその機序解明**

**9:20**　◦西川　翔[1]，　神谷美沙[1]，　青山広樹[1]，　野村真美[1]，高橋　司[2]，今泉　厚[2]，津田孝範[1]（[1]中部大・応生，[2](株)セラバリューズ）

**4A08a02　プロポリス成分による褐色脂肪細胞化の誘導と作用機構の解明**

**9:35**　◦青山広樹[1]，　西川　翔[1]，　神谷美沙[1]，　吉村一輝[2]，熊澤茂則[2]，津田孝範[1]（[1]中部大応生，[2]静岡県大食品栄養）

**4A08a03　EPA が脂肪組織における UCP1 発現誘導に及ぼす影響**

**9:50**　◦谷川貴之[1]，KIM Minji[1]，後藤　剛[1,2]，河田照雄[1,2]（[1]京大院農・食品生物，[2]京大・生理化学研究ユニット）

**4A08a04　アシタバカルコンは AMPK 経路を介して成熟白色脂肪細胞のベージュ化を促進する**

**10:05**　◦劉　軼韻[1]，山本憲郎[2]，山下陽子[1]，芦田　均[1]（[1]神戸大農，[2]ハウスウェルネスフーズ株式会社）

**4A08a05　ウメポリフェノールとその体内代謝物であるヒドロキシ桂皮酸類の高脂肪食誘導性肥満マウスにおける糖尿病予防効果**

**10:20**　◦永井宏平，　伊谷　強，　東山瑞季，　木下　晃，尾上裕太郎，　向　秀智，　山路真由，　淡路智貴，　大世渡勇紀，阪上綾花（近大生物理工）

**4A08a06　ナツメグ抽出物による糖取り込み促進効果について**

**10:35**　◦河野龍之進[1]，　前田歩海[1]，　吉岡奏淳[2]，　池田真規[1]，山下陽子[1]，芦田　均[1]（[1]神大農，[2]神大科学技術イノベーション研究科）

**a07〜a12 発表者の接続時間 10:50〜11:00**

**4A08a07　テアフラビンの経口摂取による体組成およびエネルギー消費への影響**

**11:00**　◦相澤光輝[1]，　山本采佳[1]，　上野友哉[1]，　松田秀喜[1]，菊地実奈子[2]，佐久間理英[2]，新井英一[2]（[1]焼津水産化学工業株式会

社，[2]静岡県立大学）

**4A08a08　朝食欠食モデルラットに高脂肪食を与えた場合の体脂肪および肝臓代謝リズムの変動**

**11:15**　○清水初実[1]，　半澤史聡[2]，　金　多恩[1]，　孫　淑敏[1]，梅木美樹[3]，望月　聡[3]，池田彩子[2]，小田裕昭[1]　([1]名大院生命農，[2]名古屋学芸大管理栄養，[3]大分大教育）

**4A08a09　*Euglena gracilis* Z 及び貯蔵多糖パラミロンの肝臓線維化抑制効果**

**11:30**　○中島綾香[1]，　白方有香[2]，　橋口太志[2]，　吉田主税[2]，鈴木健吾[1]，中野長久[3]　([1]株式会社ユーグレナ，[2]SMC ラボラトリーズ株式会社，[3]大阪府立大学大学院生命環境科学研究科）

**4A08a10　緑藻由来カロテノイドシフォナキサンチンの肝臓脂質合成抑制作用とそのメカニズム**

**11:45**　○鄭　家聞，真鍋祐樹，金　珉智，後藤　剛，河田照雄，菅原達也（京大農）

**4A08a11　(－)-Epigallocatechin-3-gallate の胃粘膜細胞に対するレプチン分泌刺激作用の発見**

**12:00**　○太田裕基[1]，　石井剛志[2]，　向井克之[3]，　松山彰収[3]，赤川　貢[1]([1]大阪府大院・生命環境，[2]神戸学院大・栄養，[3](株)ダイセル）

**4A08a12　LC-MS を用いたトマト含有抗炎症化合物の広範囲スクリーニングおよび同定化合物における作用機序の解明**

**12:15**　○毛利晋輔[1]，　高橋春弥[2]，　坂井麻衣子[1]，　高橋慎吾[3]，脇　尚子[2]，　相澤宏一[3]，　菅沼大行[3]，　荒　武[2]，　柴田大輔[2]，後藤　剛[1]，河田照雄[1]　([1]京大院農・食品生物，[2]京大院農・トマト講座，[3]カゴメ・イノベーション本部）

## B09 会場　午前の部（9:20〜12:30）

食品―食品機能・栄養－癌，抗癌，食品機能・栄養－その他―

**a01〜a06 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**4B09a01　Carnosine inhibits proliferation, migration and invasion in human bladder cancer EJ cells**

**9:20**　○Byungdoo Hwang,　Sung Lyea Park,　Yujin Park, Yujeong Gho,　Bog-Hieu Lee,　Sung-Kown Moon（Chung-ang Univ.）

**4B09a02　ワサビ機能性成分の抗癌作用および抗癌剤との併用効果の解析**

**9:35**　○矢野敏史[1]，坂尾こず枝[1,2]，侯　徳興[1,2]　([1]鹿大連合農研，[2]鹿大農）

**4B09a03　セージ由来 STAT3 活性化抑制物質の精製**

**9:50**　○柳道真帆[1]，　西野勝俊[1,2]，　神戸大朋[1]，　増田誠司[1]，KSOURI Riadh[3]，礒田博子[4]，永尾雅哉[1]　([1]京大院・生命，[2]京大院・農，[3]CBBC・Tunisia，[4]筑波大院・生命環境・北アフリカ研究センター）

**4B09a04　Piceatannol による制がん剤ターゲット human Glyoxalase I 阻害の解析**

**10:05**　○高澤涼子[1,2]，　赤羽　悠[1]，　嶋田奈実[1]，　山本貴之[3]，内田裕子[3]，齋　政彦[3]，吉森篤史[4]，田沼靖一[1,2]　([1]東京理大薬，[2]東京理大ゲノム創薬研セ，[3]森永製菓(株)，[4](株)理論創薬研究所）

**4B09a05　ザクロ由来ポリフェノールによる大腸ガン抑制効果とその分子基盤**

**10:20**　○花田　栄[1]，堀　美久[1]，伊東秀之[2]，片倉喜範[3]（[1]九大院生資環，[2]岡山県大保福，[3]九大院農院）

**4B09a06　食品成分ベンジルイソチオシアネートによる動原体を標的とした大腸がん細胞増殖阻害作用**

**10:35**　○安部奈緒美[1,2,3]，　國末成美[2]，　宗正晋太郎[2]，　村田芳行[2]，河合慶親[1]，佐藤あやの[4]，守屋央朗[5]，中村宜督[2]　([1]徳大院医歯薬学，[2]岡大院環境生命，[3]学振特別研究員，[4]岡大院自然科学，[5]岡大異分野コア）

**a07〜a12 発表者の接続時間 10:50〜11:00**

**4B09a07　$H_2S$ による緑茶カテキン EGCG のがん細胞致死誘導活性の増強**

**11:00**　○裵　宰君，熊添基文，立花宏文　（九大院農院・生機科）

**4B09a08　緑茶カテキン EGCG のがん幹細胞抑制作用に関与する分子の同定**

**11:15**　○山田脩平，黄　宇慧，塚本俊太郎，立花宏文　（九大農）

**4B09a09　タマネギ由来成分 Onionin A はマクロファージの活性化を制御することで腫瘍の進展を抑制する**

**11:30**　○藤原章雄[1]，　坪木純子[1]，　Horlad Hasita[1]，　野原稔弘[2]，池田　剛[2]，竹屋元裕[1]，菰原義弘[1]（[1]熊大医，[2]崇城大薬）

**4B09a10　食品機能性成分硫酸体の生理機能解明**

**11:45**　○下平武彦[1]，　黒木勝久[1]，　Liu Ming-Cheh[2]，　榊原陽一[1]，水光正仁[1]（[1]宮崎大農工総合，[2]トレド大薬）

**4B09a11　suksdorfin の脂肪細胞分化促進と糖代謝異常改善効果**

**12:00**　○岩瀬麻里[1]，　西村加奈子[1]，　高橋春弥[1]，　高橋信之[1]，谷口雅彦[2]，　馬場きみ江[2]，　村上　茂[3]，　後藤　剛[1,4]，　河田照雄[1,4]（[1]京大院農・食品生物，[2]大阪薬大・薬，[3]福井県立大・生物資源，[4]京大・生理化学研究ユニット）

**4B09a12　イサダ加工残液の亜臨界処理による有効利用**

**12:15**　○堀江茜音，小林　敬，安達修二（京大農）

## B10 会場　午前の部（9:20〜12:30）

食品―食品機能・栄養－免疫，炎症，アレルギー・アレルゲン，食品機能・栄養－その他―

**a01〜a06 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**4B10a01　NF $\kappa$ B 転写活性を抑制する食品成分の探索・解析**

**9:20**　○本田瑞希，相田美緒，薩　秀夫（前工大工）

**4B10a02　マスト細胞活性化反応に対する短鎖脂肪酸の抑制効果**

**9:35**　○藤垣　泉，笠倉和巳，八代拓也，西山千春　（東理大・基礎工）

**4B10a03　新規非タンパク性アミノ酸 DADH による免疫抑制作用**

**9:50**　○関本崇宏[1]，　八代拓也[1]，　長谷部文人[2]，　松田研一[2]，笠倉和巳[1]，西山　真[2]，西山千春[1]（[1]東理大・基礎工，[2]東大・生物生産工学研究センター）

**4B10a04　新規アミノ酸 DADH によるマスト細胞の活性抑制**

**10:05**　○白井智丈[1]，　笠倉和巳[1]，　長谷部文人[2]，　松田研一[2]，八代拓也[1]，西山　真[2]，西山千春[1]([1]東理大・基礎工，[2]東大・生セ）

**4B10a05　転写因子 PU.1 のアレルギー疾患治療標的としての有効性**

**10:20**　○小田祥人，笠倉和巳，八代拓也，西山千春（東理大・基礎工）

**4B10a06　イシモズクがショウジョウバエ遺伝子発現に与える影響：DNA マイクロアレイ解析**

**10:35**　○中井雄治，福田　覚，永長一茂（弘前大・食料研）

**a07〜a12 発表者の接続時間 10:50〜11:00**

**4B10a07　食品機能性評価における活性値と作用機序の同時予測の可能性**

**11:00**　○永浜清子，山森一人，江藤　望，西山和夫，水光正仁，榊原陽一（宮崎大院・農工総合）

**4B10a08　和食固有素材を用いた統合代謝動態応答プロファイリング評価システムの構築**

**11:15**　○嶋　秀明[1]，　益田静香[1]，　伊達康博[2,3]，　篠阿弥宇[2]，梶川瑞穂[1]，井上能博[1]，菊地　淳[2,3,4]　([1]昭和薬科，[2]理研 CSRS，[3]横市院・生医，[4]名大院・生命農）

**4B10a09　放射性セシウムによる内部被ばくを防ぐ食品成分探索のための評価系**

**11:30**　○保田倫子，徳山千佳，唐木晋一郎，下位香代子（静岡県大食）

**4B10a10　農産物中の健康機能性分の探索方法に関する検討**

**11:45**　○梅林志浩（鳥取産技セ）

**4B10a11　稲発酵粗飼料用品種「たちすずか」中の糖の経時的変化とサイレージ発酵による影響**

**12:00**　○木村俊之[1]，草佳那子[2]，上垣隆一[3]　([1]農研機構食品研究部門，[2]農研機構中央農業研究センター，[3]農研機構動物衛生研究部門）

**4B10a12　穀類に含まれるオリザノール様成分(ステリルフェルレ**

イト)の研究
**12:15** ○都築和香子[1]，茂樋裕之[2]，川原修司[3]，小竹英一[1]，今場司朗[1]，金井良和[1]，堀金　彰[1]（[1]農研機構食品研究部門，[2]千葉製粉(株)，[3]横山製粉(株)）

## C11 会場　午前の部（9:20〜12:30）

有機化学，天然物化学―天然物－生合成，代謝―

**a01〜a06 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**4C11a01　イネいもち病菌のネクトリアピロン類の生産誘導条件の探索と大量生産株の作製**
**9:20** ○本山高幸，田中陽子，長田裕之（理研 CSRS・ケミカルバイオロジー）
**4C11a02　イネいもち病菌におけるかび毒テヌアゾン酸の生産制御機構**
**9:35** ○尹　忠銖，本山高幸，長田裕之（理研 CSRS・ケミカルバイオロジー）
**4C11a03　イネいもち病菌におけるピリクロール類生合成に関わる FAD 依存性モノオキシゲナーゼ遺伝子の解析**
**9:50** ○古山祐貴[1,2]，本山高幸[1]，野川俊彦[1]，鎌倉高志[2]，長田裕之[1]（[1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー，[2]東理大院理工・応生）
**4C11a04　プレニル化インドールアルカロイド okaramine 生合成における azetidine 環合成酵素の同定**
**10:05** ○加藤直樹[1]，大髙潤之介[1]，衣笠清美[1]，古谷章悟[2]，高橋俊二[1]，松田一彦[2]，長田裕之[1]（[1]理研 CSRS，[2]近畿大・農）
**4C11a05　麹菌 *Aspergillus oryzae* が有する新奇セスキテルペン生合成経路の解明**
**10:20** ○篠原靖智[1]，高橋俊二[2]，長田裕之[2]，小山泰二[1]（[1]野田産研，[2]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー）
**4C11a06　ショウジョウバエにおけるエクダイソン生合成過程での 3 位の還元反応の意義**
**10:35** ○小野　肇，齊藤惇基，吉永直子，森　直樹（京大院農）

**a07〜a12 発表者の接続時間 10:50〜11:00**

**4C11a07　クチナシ含有イリドイドに対するハスモンヨトウ幼虫の解毒機構**
**11:00** ○岩井崇晃，志野真実子，内藤裕彬，吉永直子，森　直樹（京大院農）
**4C11a08　イネ（*Oryza sativa*）に対する酢酸処理による乾燥耐性付与に伴う代謝変化**
**11:15** ○伊左治俊策[1]，吉永直子[1]，土生芳樹[2]，森　直樹[1]（[1]京大農，[2]農研機構）
**4C11a09　*Blautia producta* ATCC27340 におけるリグナン *O*-デメチラーゼ候補遺伝子の探索**
**11:30** ○久留栞美[1]，鈴木史朗[1]，内海龍太郎[2]，梅澤俊明[1]（[1]京都大学生存圏研究所，[2]近畿大院・農・バイオ）
**4C11a10　昆虫におけるインドール酢酸の生合成に関する研究**
**11:45** ○横山千晃[1]，永田晋治[3]，上妻由章[2]，鈴木義人[2]（[1]茨大院・農，[2]茨大・農，[3]東大院・新領域・先端生命）
**4C11a11　リンゴ実生における Phlorizin 類の生成と代謝に関する研究**
**12:00** ○小山愛美[1]，常盤野哲生[2]，水野幸一[2]，小森貞男[3]，吉澤結子[2]（[1]秋田県立大生資科院，[2]秋田県立大生資科，[3]岩手大農）
**4C11a12　傷害を受けたイネにおける isopentylamine の蓄積**
**12:15** ○加茂万莉奈[1]，寺石政義[2]，村山哲也[1]，石原　亨[3]，奥本　裕[2]，森　直樹[2]，網干貴子[1]（[1]山形大農，[2]京大院農，[3]鳥取大農）

## C12 会場　午前の部（9:20〜12:30）

有機化学，天然物化学―合成，反応機構―

**a01〜a06 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**4C12a01　エナミドの分子内酸化的カップリングによるオキサゾール誘導体の効率的合成**
**9:20** ○神谷　緑，園田素啓，谷森紳治（阪府大院生命環境）
**4C12a02　ボタンボウフウの生理活性成分イソサミジンの合成研究**
**9:35** ○木下麻美，阪口祐貴，赤川　貢，園田素啓，谷森紳治（阪府大院生命環境）
**4C12a03　Inagami-Tamura EDLF（Endogenous Digitalis-Like Factor）の合成化学的研究：多様な候補物質の合成**
**9:50** ○橋本圭古，池田　藍，西川俊夫，中崎敦夫（名大院生命農）
**4C12a04　ピロロピラジノン骨格の新規合成法とペラミンの全合成**
**10:05** ○山本雄太，西川俊夫，中崎敦夫（名大農）
**4C12a05　電子密度制御によるイミダゾール環の位置選択的なプレニル化および逆プレニル化反応**
**10:20** ○中根嘉祈，中崎敦夫，西川俊夫（名大院生命農）
**4C12a06　セスペンドールの合成研究 芳香環セグメントの不斉合成**
**10:35** ○小野義貴，植木佳織，西川俊夫（名大農）

**a07〜a12 発表者の接続時間 10:50〜11:00**

**4C12a07　セスペンドールの合成研究　セスキテルペンセグメントの不斉合成**
**11:00** ○植木佳織，スシヲングジットラ，西川俊夫（名大農）
**4C12a08　オシラトキシン D の合成研究**
**11:15** ○新木悠介，野倉吉彦，西川俊夫（名大院生命農）
**4C12a09　Artemisidiyne A の合成研究**
**11:30** ○前田康希，久世雅樹，滝川浩郷（神戸大院・農）
**4C12a10　Sorgomol 光学活性体の合成**
**11:45** ○山田莉子，秦　大介，久世雅樹，滝川浩郷（神戸大院･農）
**4C12a11　Ramariolide 類の化学合成**
**12:00** ○森口舞子，久世雅樹，滝川浩郷（神戸大院農）
**4C12a12　高輝度発光基質による発光タンパク質フォラシンの再構成と発光活性**
**12:15** ○大西里佳，久世雅樹，滝川浩郷（神戸大院農）

## C13 会場　午前の部（9:20〜12:15）

有機化学，天然物化学―天然物－単離構造決定－動物，農薬―

**a01〜a06 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**4C13a01　イサダ(ツノナシオキアミ)脂質の解析**
**9:20** ○山田秀俊[1]，箱崎真友佳[1]，山崎裕也[2]，小池誠治[2]，長洞　希[1]，矢野　明[1]（[1]岩手生工研，[2](株)ADEKA）
**4C13a02　イラガ幼虫分泌液由来の TRPV1 活性物質の探索**
**9:35** ○水谷真里絵，平川祥成，今井邦雄，勝崎裕隆　（三重大）
**4C13a03　クルミホソガの種内での寄主転換に関与する産卵刺激物質の特定**
**9:50** ○下田将大[1]，勝手智子[1]，小林拓矢[1]，吉永直子[1]，森　直樹[1]，大島一正[2]，小野　肇[1]（[1]京大農，[2]京都府立大・生命環境）
**4C13a04　マドボタル亜科のホタルが持つステロイド毒 bufadienolide の化学分析**
**10:05** ○氏家里奈子[1]，吉田達哉[1]，竹内寛彦[2]，江頭幸士郎[3]，城野哲平[4]，吉永直子[1]，小野　肇[1]，森　哲[5]，森　直樹[1]（[1]京大院農，[2]京大フィールド研，[3]京大院人環，[4]琉球大熱生研，[5]京大院理）
**4C13a05　ヤエヤマサソリの毒液に含まれる抗菌性ペプチドの探索と同定**
**10:20** ○岡部諒太[1]，北中淳史[1]，内山博允[2]，須恵雅之[2]，宮下正弘[1]，中川好秋[1]，宮川　恒[1]（[1]京大院農，[2]東京農大）

**4C13a06　ササ葉抽出物の氷核形成阻害活性を利用した霜害防止の試み**
**10:35**　◦鈴木伸吾，福田　怜，福士幸治，荒川圭太（北大農）

**a07〜a11 発表者の接続時間 10:50〜11:00**

**4C13a07　ブタン型リグナン，ノルリグナン，ネオリグナンの生物活性の比較**
**11:00**　◦西本明日香[1]，西脇　寿[1]，西　甲介[1]，菅原卓也[1]，秋山浩一[2]，山内　聡[1]（[1]愛媛大農，[2]学術支援センター）
**4C13a08　昆虫ステロイドホルモン生合成制御因子 Noppera-bo の X 線結晶構造解析：活性阻害剤との相互作用と創農薬への知見**
**11:15**　◦丹羽隆介[1]，稲葉和恵[1]，小祝孝太郎[2]，諸橋香奈[1]，塩谷　天[1]，井上英史[3]，藤川雄太[3]，湯本史明[2]，千田俊哉[2]（[1]筑波大生命環境，[2]高エネ研 IMSS，[3]東薬大生命）
**4C13a09　ターゲットに変異をもつ Dieldrin 抵抗性昆虫に対する環状塩素系殺虫剤の作用**
**11:30**　◦田中啓司[1,3]，高市成美[1]，松田一彦[1]，尾添嘉久[2]（[1]近大農，[2]島根大生物資源，[3]名大 iMass 研）
**4C13a10　ショウジョウバエ D $\alpha$ 1-ヒヨコ $\beta$ 2 ニコチン性アセチルコリン受容体のネオニコチノイド感受性に対する D $\alpha$ 1 サブユニットの 3 loop の寄与**
**11:45**　◦疋田麻衣，山中恭佑，松下裕幸，古谷章悟，伊原　誠，松田一彦（近畿大・農）
**4C13a11　ウンシュウミカン幼果由来のテルペン類を利用したミカンバエの誘引法の開発**
**12:00**　◦大竹　潤[1]，東浦祥光[2]，大野　慧[1]，吉永直子[1]，森　直樹[1]，西田律夫[1]，小野　肇[1]（[1]京大院農，[2]山口県農林総合技術センター）

## C14 会場　午前の部（9:20〜12:30）

有機化学，天然物化学―天然物－ケミカルバイオロジー，作用機構，天然物－生合成，代謝―

**a01〜a06 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**4C14a01　有毒藍藻 *Anabaena circinalis*（TA04）からの未知麻痺性貝毒サキシトキシン類縁体の探索**
**9:20**　◦美野輪高之[1]，長由扶子[1]，土屋成輝[1]，此木敬一[1]，大島泰克[2]，山下まり[1]（[1]東北大院農，[2]東北大院生命）
**4C14a02　フグにおける新規テトロドトキシン関連化合物の探索**
**9:35**　◦上山　望，杉本敬太，長由扶子，此木敬一，山下まり（東北大院農）
**4C14a03　記憶喪失性貝毒ドウモイ酸新規関連化合物の探索**
**9:50**　◦海老根優香理[1]，小瀧裕一[2]，寺田竜太[3]，長由扶子[1]，此木敬一[1]，山下まり[1]（[1]東北大院農，[2]北里大海洋，[3]鹿児島大院連合農）
**4C14a04　テルペン環化酵素の機能改変とアイソトポマーを用いた反応機構解析**
**10:05**　◦中川和也，夏目雅裕，川出　洋（東京農工大院農）
**4C14a05　mRNA 成熟阻害活性を持つフラボノイドの作用機序の解明**
**10:20**　◦倉田雅志[1,2]，増田誠司[2]（[1]名市大医，[2]京大生命）
**4C14a06　合成ユビキノンは出芽酵母ミトコンドリア電位依存性アニオンチャンネル（VDAC）に特異的に結合する**
**10:35**　◦村井正俊[1]，奥田絢香[1]，山本武範[2]，篠原康雄[2]，三芳秀人[1]（[1]京大院・農学研究科，[2]徳島大・先端酵素学研究所）

**a07〜a12 発表者の接続時間 10:50〜11:00**

**4C14a07　ミトコンドリア呼吸鎖複合体-I の位置特異的化学修飾**
**11:00**　◦桝谷貴洋，村井正俊，三芳秀人（京大農）
**4C14a08　コレラ菌 NADH-キノン酸化還元酵素の阻害剤コロルミシンの単離と全合成研究**
**11:15**　◦伊藤　剛[1]，戸崎龍彦[1]，村井正俊[1]，BARQUERA Blanca[2]，三芳秀人[1]（[1]京大院・農，[2]レンセラー工科大学・生物科学）
**4C14a09　Aplysiatoxin 単純化アナログ・10-Me-aplog-1 のフェノール性側鎖が各種生物活性に与える影響**
**11:30**　◦花木祐輔[1]，菊森将之[1]，徳田春邦[1]，岡村睦美[2]，旦　慎吾[2]，柳田　亮[3]，入江一浩[1]（[1]京大院農，[2]がん研，[3]香川大農）
**4C14a10　漢方由来 ウンカリン酸 C によるアミロイド $\beta$ 42 核形成阻害メカニズム**
**11:45**　◦吉岡卓也[1]，村上一馬[1]，花木瑞穂[1]，緑川諭弘[2]，谷脇慎治[2]，郡司祐樹[2]，川瀬泰司[3]，廣瀬賢治[3]，入江一浩[1]（[1]京大院農，[2]アルプス薬品工業，[3]日本ウォーターズ）
**4C14a11　アミロイド $\beta$ 40 の毒性オリゴマーモデル**
**12:00**　◦入江由美[1]，村上一馬[1]，花木瑞穂[1]，花木祐輔[1]，鈴木天志[1]，物部容子[2]，高井朋代[2]，赤木謙一[2]，川瀬泰司[3]，廣瀬賢治[3]，入江一浩[1]（[1]京大院農，[2]医薬基盤研究所，[3]日本ウォーターズ株式会社）
**4C14a12　アミロイド $\beta$ 42 の 35 番目でジスルフィド架橋したダイマーの合成と活性評価**
**12:15**　◦村上一馬[1]，加藤春花[1]，花木瑞穂[1]，物部容子[2]，赤木謙一[2]，入江一浩[1]（[1]京大農，[2]医薬基盤健康栄養研）

## C15 会場　午前の部（9:20〜12:00）

微生物―細胞－分離，分類，生態―

**a01〜a06 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**4C15a01　Investigation of Thermophilic Bacteria in Volcanic Ash of Mt. Sinabung-Indonesia**
**9:20**　◦Fandi Hidayat[1,2]，Ryo Fujimoto[1]，Yuki Okugawa[1]，Yukihiro Tashiro[1]，Hasril Hasan Siregar[2]，Kenji Sakai[1]（[1]Kyushu Univ.，[2]Indonesian Oil Palm Research Institute（IOPRI））
**4C15a02　段階希釈を用いたセルロース分解微生物の集積培養**
**9:35**　◦織田康太郎[1]，横山和平[2]，藤井克彦[2]（[1]山大農，[2]山大院創成）
**4C15a03　Genomic characterization of a new methylotroph, Ohaeibacter diazotrophicus SM30**
**9:50**　◦HAOXIN LYU，AKIO TANI（IPSR, Okayama Univ.）
**4C15a04　乳幼児から分離された *Bifidobacterium bifidum* TMC3115 株のゲノム解析とその特性**
**10:05**　◦原田　岳[1]，依田一豊[1]，宮澤賢司[1]，山崎和幸[1]，平松　優[1]，何　方[1]，遠藤明仁[2]（[1]タカナシ乳業(株)商品研究所，[2]東農業大生産）
**4C15a05　新奇セルロース分解海洋細菌 *Gilvimarinus japonicus* の特性と海藻分解能の研究**
**10:20**　◦江水秀之[1]，時川鴻希[2]，里見正隆[3]，島袋勝弥[4]，藤井克彦[5]（[1]山大院農，[2]山大農，[3]中央水研，[4]宇部高専・物質工学，[5]山大院創成）
**4C15a06　MALDI-TOF MS を用いた担子菌類同定における菌糸増殖期が及ぼすタンパク質の変化**
**10:35**　◦岩本孝樹，浜田亮祐，堀沢　栄（高知工科大学）

**a07〜a10 発表者の接続時間 10:50〜11:00**

**4C15a07　イオン交換樹脂と細菌における伝導率の関係**
**11:00**　◦丸山聖羅[1]，渡邊彬宏[1]，小林　徹[2]，三浦　健[1]（[1]東洋大学，[2]海洋研究開発機構）
**4C15a08　フルクトフィリック乳酸菌 *Fructobacillus fructosus* NRIC 1058$^T$ の生育特性における *adhE* 遺伝子の影響**
**11:15**　◦前野慎太朗[1]，梶川揚申[2]，中川純一[1]，遠藤明仁[1]（[1]東農大生物産業，[2]東農大応用生物科学）
**4C15a09　無機的環境下における真菌類の単体硫黄の酸化**
**11:30**　◦佃　眞緒[1]，大岩祐児[1]，北原直樹[1]，高原　勇[1]，佐藤　勉[2]，片山葉子[1]（[1]東京農工大院農，[2]株式会社秋田今野商店）
**4C15a10　The mechanism of curcumin-degradation by microorganisms**
**11:45**　◦Shuai Shao，Tairo Hagishita，Yoshifumi Shinoda，Sakayu Shimizu（Dept. microbio., Kyoto gakuen Univ.）

## C17 会場　午前の部（9:35〜12:00）

微生物―細胞－情報伝達，細胞応答，ストレス応答，物質生産－醸造，発酵(一次代謝産物)―

**a02〜a06 発表者の接続時間 9:25〜9:35**

**4C17a02　バイオマス由来発酵阻害物質ストレス下における *ADH7* の優先的翻訳とその応用**
**9:35**　◦石田陽子，Nguyen Trinh，井澤真吾（京工繊大応生）

**4C17a03　酢酸ストレスによる酵母小胞体ストレス応答の誘導**
**9:50**　◦河添希美[1]，木俣行雄[2]，井澤真吾[1]（[1]京工繊大 応生，[2]奈良先端科技院大　バイオ）

**4C17a04　大気圧低温プラズマによる真菌殺菌機構に関する研究：protein quality control に及ぼす影響の解析**
**10:05**　◦糸岡洸樹[1]，木俣行雄[2]，井澤真吾[1]（[1]京工繊大応生，[2]奈良先端科技院大バイオ）

**4C17a05　酵母メタノール誘導性遺伝子発現のシグナル伝達経路の解析**
**10:20**　◦大澤　晋，阪井康能，由里本博也（京大農）

**4C17a06　酵母 Hog1 の細胞内隔離は熱耐性を向上させる**
**10:35**　◦白石晃将[1,2]，日置貴大[1]，由里本博也[1]，阪井康能[1]（[1]京大院農，[2]日本学術振興会特別研究員）

**a07〜a10 発表者の接続時間 10:50〜11:00**

**4C17a07　黄麹菌 *Aspergillus oryzae* を用いたアグマチン高生産**
**11:00**　◦加藤彩織[1]，赤坂直紀[2]，石井友理[1]，秀瀬涼太[1]，藤原伸介[1]（[1]関学大理工，[2]マルカン酢(株)）

**4C17a08　エチル α-$_D$-グルコシド(α-EG)の線維芽細胞に与える効果**
**11:15**　◦三谷恵一[1]，大浦友紀[1]，坊垣隆之[1,2]，尾関健二[2,3]（[1]大関(株)・総研，[2]金工大・院・工・バイオ化学，[3]金工大・バイオ化学・応用バイオ）

**4C17a09　ビス型第四アンモニウム塩を用いた高粘度培養液からの簡便なポリグルタミン酸回収法の検討と生じた複合体の利用**
**11:30**　◦劉　涛[1]，延嶋浩文[2]，尾島由紘[1]，東　雅之[1]（[1]大阪市立大学，[2]タマ化学工業株式会社）

**4C17a10　海洋性微生物のジピコリン酸生産性評価**
**11:45**　◦高野仁美，阪本鷹行，櫻谷英治（徳島大・生物資源）

## C18 会場　午前の部（9:20〜12:30）

微生物―遺伝子－構造，機能―

**a01〜a06 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**4C18a01　分裂酵母 D-アラビノース脱水素酵素遺伝子のスクリーニング**
**9:20**　◦尼子克己[1]，大倉未奈子[1]，竹澤有美[1]，東　慶直[2]，田中克典[3]（[1]仁愛大人間生活，[2]近畿大生物理工，[3]関学大理工）

**4C18a02　分裂酵母 *S. pombe* における前胞子膜の外膜溶解に関わる遺伝子の同定と解析**
**9:35**　◦張　博文，今田一姫，寺口絵理香，田原悠平，宮田真人，中村太郎（大阪市大院理）

**4C18a03　酵母由来 GPI アンカー型グルカノシルトランスフェラーゼによる耐酸性・耐塩性の強化**
**9:50**　◦松鹿昭則[1,2]，鈴木俊宏[1]，五島徹也[3]，星野　保[1,2]（[1]産総研・機能化学，[2]広島大院・先端物質，[3]酒総研）

**4C18a04　分裂酵母 *S. japonicus* の CoQ 生合成酵素遺伝子の相補試験及び基質化合物の添加による合成量への影響**
**10:05**　◦渡子　開，望月汐美，戒能智宏，川向　誠（島根大生物資源科学）

**4C18a05　植物生長促進作用に関与する *Pseudomonas fluorescens* 遺伝子の単離**
**10:20**　◦中岡知規[1]，澤田祥子[2]，大浦麻里[1]，田中雄矢[2]，阿野貴司[1,2]，岡南政宏[1,2]（[1]近畿大院，[2]近畿大）

**4C18a06　大腸菌における新規 *yafDyafE* toxin-antitoxin system の同定及び機能解析**
**10:35**　◦中嶋菜衣[1]，横井亮磨[1]，山口良弘[1,2]（[1]阪市大理，[2]阪市大複合先端研）

**a07〜a12 発表者の接続時間 10:50〜11:00**

**4C18a07　ゲノム編集による *Kluyveromyces marxianus* の自在な遺伝子改変**
**11:00**　◦南部-西田由美子[1,2]，西田敬二[3]，蓮沼誠久[3]，近藤昭彦[1,3]（[1]神戸大院・工，[2]高機能遺伝子デザイン技術研究組合，[3]神戸大院・イノベ）

**4C18a08　コリネ型細菌における転写終結因子 Rho の発現制御**
**11:15**　◦田中裕也[1]，竹本訓彦[1]，山本祐司[2]，乾　将行[1,2]（[1]RITE，[2]奈良先端大・バイオ）

**4C18a09　アラビノキシラン利用能を有するコリネ型細菌の創製**
**11:30**　◦久下貴之[1,2]，渡邉　彰[2]，長谷川智[2]，寺本陽彦[2]，乾　将行[1,2]（[1]奈良先端大，[2]RITE）

**4C18a10　*C. glutamicum* のグルコキナーゼ遺伝子の機能解析**
**11:45**　◦塚田悠太[1,2]，小暮高久[2]，乾　将行[1,2]（[1]奈良先端大・バイオ，[2]RITE）

**4C18a11　コリネ型細菌における芳香族化合物に対するストレス耐性機構の解析**
**12:00**　◦小倉崚司[1,2]，久保田健[2]，乾　将行[1,2]（[1]奈良先端大・バイオ，[2]RITE）

**4C18a12　コリネ型細菌におけるアスパラギン酸生合成酵素の機能解析と遺伝子発現解析**
**12:15**　◦土門晃大[1,2]，福井郁美[1,2]，須田雅子[2]，西村　拓[2]，平賀和三[2]，乾　将行[1,2]（[1]奈良先端大・バイオ，[2]RITE）

## C19 会場　午前の部（9:20〜10:50）

微生物―細胞－栄養，生育，増殖―

**a01〜a06 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**4C19a01　発酵熱の生成機構に関する研究(第 2 報)**
**9:20**　◦吉村　徹[1]，榊原舞子[1]，伊藤智和[1]，西村圭祐[1]，高橋克忠[2]，羽田亜紀[2]，邊見　久[1]（[1]名大院生命農学，[2]けいはんな文化学術協会 微生物計測システム研究所）

**4C19a02　好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 の heterodisulfide reductase に関する研究**
**9:35**　◦小倉一将，新井博之，石井正治（東大農生科）

**4C19a03　バクテリア巨大化スフェロプラストは，線維化を経て 2 分裂細胞に戻るか？**
**9:50**　◦高橋沙和子，西田洋巳（富山県大工）

**4C19a04　好気性紅色光合成細菌スフェロプラスト巨大化における呼吸と光合成の影響**
**10:05**　◦西野弘起，中澤　舞，西田洋巳（富山県大）

**4C19a05　*Methylobacterium* 属細菌は植物葉上でパントテン酸を獲得する**
**10:20**　◦吉田裕介，由里本博也，阪井康能（京大院農）

**4C19a06　担子菌ヒトヨタケおよびヒラタケにおける pex1 破壊株の表現型の共通点と相違点**
**10:35**　◦中沢威人，本田与一（京大農）

## C20 会場　午前の部（9:20〜12:15）

微生物―遺伝子－ゲノム解析，メタゲノム，プロテオーム，バイオインフォーマティクス―

**a01〜a06 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**4C20a01　PCB/ ビフェニル分解菌 Alcaligenes denitrificans A41 株のポリヒドロキシアルカン酸(PHA)合成関連遺伝子の解析**
**9:20**　◦永友瑞希，前田理久（明治大学大学院農学研究科）

**4C20a02　ビフェニル /PCB 分解性 *Pseudomonas* 細菌の *bph-sal***

**element 上にコードされるサリチル酸および安息香酸分解系遺伝子のクローニングおよび機能解析**
**9:35** ○廣瀬　遵[1]，　米村　凌[1]，　横井春比古[1]，　末永　光[2]，木村信忠[3]，　渡邊崇人[4]，　二神泰基[5]，　後藤正利[6]，　藤原秀彦[7]，古川謙介[7]（[1]宮崎大工・環境応用化，[2]産総研・創薬基盤，[3]産総研・生物プロセス，[4]京大・生存研，[5]鹿大・農，[6]佐賀大・農，[7]別府大・食物栄養）

**4C20a03　ビフェニル /PCB 分解能力を高頻度に転移・欠失する *Pseudomonas putida* KF715 株のゲノム構造の柔軟性**
**9:50** ○末永　光[1]，　藤原秀彦[2]，　木村信忠[3]，　廣瀬　遵[4]，渡邊崇人[5]，二神泰基[6]，後藤正利[7]，古川謙介[2]（[1]産総研・創薬基盤，[2]別府大･食物，[3]産総研･生物プロセス，[4]宮崎大･工，[5]京大･生存研，[6]鹿児島大・農，[7]佐賀大・農）

**4C20a04　海水と海底堆積物の細胞外 DNA における可動性遺伝因子の濃縮**
**10:05** ○高橋裕里香[1]，　宮西謙弥[1]，　中野椋太[1]，　畠　俊郎[2]，西田洋巳[1]（[1]富山県大生工科・生工セ，[2]富山県大環工科）

**4C20a05　プラスミドを持つ宿主の fitness（適応度）を増加させる原因因子の同定**
**10:20** ○LE THI THANH THU[1]，片岡大亮[1]，道羅英夫[2]，金原和秀[3]，新谷政己[3]（[1]静大院，[2]静大，グリーン研，[3]静大工，静大院，静大創造院）

**4C20a06　ヤナギマツタケ（*Agrocybe cylindracea*）の子実体で高発現するタンパク質の遺伝子解析**
**10:35** ○橋本みつき[1]，　廣岡侑磨[1]，　岩田眞人[2]，　松元俊彦[1]，安藤祥司[1]（[1]崇城大生物生命，[2]アイエムビー）

**a07〜a11 発表者の接続時間 10:50〜11:00**

**4C20a07　微生物叢解析における DNA 抽出方法の影響　〜土壌と糞便を例に〜**
**11:00** ○三浦隆匡，平方里美，山副敦司，川﨑浩子　((独)製品評価技術基盤機構 バイオテクノロジーセンター）

**4C20a08　最確数・制限酵素多型断片長解析による環境中の硫酸還元菌群集の同定・定量条件の検討**
**11:15** ○渡辺克二，松本邦成（福工大工）

**4C20a09　耐熱性メタゲノムライブラリーの構築とカタラーゼ遺伝子の探索**
**11:30** ○奥村史朗[1]，　片山秀樹[1]，　山下聡子[1]，　仲山真美[2]，冨岡寛治[3]（[1]福岡県工技セ，[2]SG ラボラトリー，[3]久留米高専）

**4C20a10　洗濯環境および衣類に付着するバクテリア叢の解析**
**11:45** ○松村吉信[1,2]，　井上貴晴[1]，　佛淵健士[1]，　冨岡敏一[1]，脇田克也[3]（[1]関西大化学生命工，[2]関西大 ORDIST，[3]パナソニック・アプライアンス社）

**4C20a11　*Ktedonobacteria* 綱に属する放線菌様細菌の分子遺伝学的手法の検討**
**12:00** ○水野　勇[1]，　矢部修平[2]，　兼崎　友[3]，　佐々木康幸[4]，横田　明[2]，上田賢志[1]，高野英晃[1]（[1]日大生資科・生命セ，[2]東北大院・農，[3]東農大・ゲノム解析セ，[4]東農大・応生科・バイオ）

## C23 会場　午前の部（9:20〜12:30）

微生物―物質生産－醸造，発酵（一次代謝産物）―

**a01〜a06 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**4C23a01　C14 fatty acid production by the oomycete *Plectospira myriandra***
**9:20** ○Brian Mo，Akinori Ando，Hirotaka Asai，Jun Ogawa（Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.）

**4C23a02　油糧糸状菌 *Mortierella alpina* から誘導したリシノール酸生産性変異株について**
**9:35** ○井出紗奈江[1]，　阪本鷹行[1]，　安藤晃規[2]，　岸野重信[2]，和泉自泰[3]，馬場健史[3]，島　　純[4]，小川　順[2]，櫻谷英治[1]（[1]徳島大･生物資源，[2]京大院農・応用生命，[3]九大・生体防御，[4]龍谷大・農）

**4C23a03　組換え大腸菌によるグルコースを原料とする 4-アミノ桂皮酸の直接発酵生産**
**9:50** ○川口秀夫[1]，　若井桂子[1]，　桝尾俊介[3]，　高谷直樹[3]，荻野千秋[2]，近藤昭彦[1,2]（[1]神戸大院イノベ，[2]神戸大院工，[3]筑波大生命環境）

**4C23a04　組み換え乳酸菌を用いたデンプンからの D- 乳酸の直接発酵生産**
**10:05** ○椿　幹和，小原仁実，麻生祐司（京都工繊大院）

**4C23a05　吟醸用群馬 KAZE 酵母のイオンビーム照射による尿素非生産化の検討**
**10:20** ○渡部貴志[1]，　佐藤勝也[2]，　林　秀謙[3]，　高橋仁恵[1]，増渕　隆[1]（[1]群技セ，[2]量研機構，[3]前橋工大）

**4C23a06　生酛乳酸菌の共存が誘導する清酒酵母の炭素代謝改変及び清酒醸造への効果**
**10:35** ○伊藤　稔[1]，　渡辺大輔[1]，　杉本幸子[1]，　大橋正孝[2]，山田　翼[3]，高橋俊成[3]，高木博史[1]（[1]奈良先端大バイオ，[2]奈良産総セ，[3]菊正宗酒造(株)）

**a07〜a12 発表者の接続時間 10:50〜11:00**

**4C23a07　アルコール発酵制御に関わる新規遺伝子の探索から明らかになった酵母 VTC 複合体の役割**
**11:00** ○吉岡直哉，渡辺大輔，高木健一，杉本幸子，高木博史（奈良先端大バイオ）

**4C23a08　ビール醸造におけるアルコール発酵と *S*-アデノシルメチオニンの関連について**
**11:15** ○渡辺大輔[1]，　大室　繭[2]，　杉本幸子[1]，　梶原拓真[1]，加藤　拓[2]，本山靖朗[2]，渡邊哲也[2]，高木博史[1]（[1]奈良先端大，[2]アサヒビール(株)）

**4C23a09　高濃度エタノールによる翻訳抑制下で優先的に翻訳される *BTN2* mRNA のワイン酵母での解析**
**11:30** ○井澤真吾，加藤沙枝，山内雪菜（京工繊大応生）

**4C23a10　清酒醪で優先的に発現する酵母遺伝子の探索**
**11:45** ○濱砂孝文[1]，　佐田尚隆[1]，　徳井美里[1]，　山内隆寛[1]，山下伸雄[1]，明石貴裕[1]，井澤真吾[2]（[1]白鶴酒造･研究，[2]京工繊大･応生）

**4C23a11　変異チオール酸化酵素による酵母の酸化型グルタチオン生産**
**12:00** ○小林淳平[1]，　佐々木大介[1]，　原　清敬[2]，　蓮沼誠久[1]，近藤昭彦[1]（[1]神大院・イノベ，[2]静県大・食品栄養）

**4C23a12　*Saccharomyces cerevisiae* による 1,2,4-ブタントリオール生産技術の開発**
**12:15** ○番場崇弘[1]，蓮沼誠久[2]，近藤昭彦[2]　([1]神戸大院・工学，[2]神戸大院・科学技術イノベーション）

## C24 会場　午前の部（9:20〜12:00）

微生物―代謝－代謝調節，発酵生理，メタボローム―

**a01〜a06 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**4C24a01　ストレス応答に関連する *Moniliella megachiliensis* 由来 *transketolase* の機能役割**
**9:20** ○岩田悠志[1]，伏屋瑞季[2]，安彦良祐[1]，渡邉泰祐[1,2]，荻原　淳[1,2]，春見隆文[1,2]（[1]日大生資科・生命化，[2]日大院生資研究科・生資利用）

**4C24a02　*Candida versatilis* SN-18 におけるマンニトール代謝機構の解明**
**9:35** ○伏屋瑞季[1]，水島大貴[1,3]，土田真由[2]，岩田悠志[2]，渡邉泰祐[1,2]，荻原　淳[1,2]，春見隆文[1,2]（[1]日大院生資研究科・生資利用，[2]日大生資科・生命化，[3]農研機構・食品研究部門）

**4C24a03　代謝改変シアノバクテリアによるソルビトールの光合成生産**
**9:50** ○陳　泰駿，奥田裕紀子，池内昌彦　（東大・院総合文化）

**4C24a04　*Bifidobacterium longum* 105-A のメチオニン利用に関与する遺伝子の発現解析および遺伝子破壊による検証**
**10:05** ○和田　大[1]，　松本菜々恵[1]，　小松一喜[1]，　阪中幹祥[2]，松尾実紀[1]，吹谷　智[1]，横田　篤[1]（[1]北大院農，[2]石川県大）

**4C24a05　高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来 isopropylmalate synthase のアシル化修飾による活性制御機構の解析**

**10:20** ○吉田彩子[1]，吉田　稔[2]，古園さおり[1]，西山　真[1]（[1]東大・生物工学セ，[2]理研・CSRS）

**4C24a06　納豆菌によるオロト酸生産のための *pyrE* 破壊遺伝子の構築**

**10:35** ○七尾圭香，袴田佳宏，大箸信一（金沢工業大学ゲノム生物工学研究所）

**a07〜a10 発表者の接続時間 10:50〜11:00**

**4C24a07　大腸菌におけるエネルギー代謝の切り替え機構**

**11:00** ○島田友裕，田中　寛（東工大・化生研）

**4C24a08　キヌレニンアミノトランスフェラーゼの遺伝子破壊による出芽酵母キヌレン酸欠乏株の構築**

**11:15** ○大橋一登（群馬大学）

**4C24a09　海洋性エチレン資化性菌の Epoxyalkane Coenzyme M Transferase（EaCoMT）**

**11:30** ○鈴木竜大郎[1]，鈴木敏弘[3]，羽部　浩[2]，布施博之[4]（[1]芝工大院 シ，[2]産総研 環境管理，[3]東京農大 応用生物，[4]芝工大 生命）

**4C24a10　大型褐藻を原料とした酵母発酵へ向けて：褐藻多糖アルギン酸由来モノウロン酸 DEH 資化能の適応進化による向上**

**11:45** ○河井重幸[1,2]，　松岡史也[1]，　柏原貴幸[1]，　田中秀樹[1]，佐薙潤季[2]，橋本　渉[1,2]，村田幸作[3]（[1]京大院農，[2]京大農，[3]摂南大理工）

## C25 会場　午前の部（9:20〜12:00）

微生物―物質生産－酵素，タンパク質―

**a01〜a06 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**4C25a01　リンカー領域に規則性の高いアミノ酸配列を持った好熱性放線菌由来セルラーゼの酵素化学的解析**

**9:20** ○松浦愛奈[1]，堀江瞳美[1]，河合富佐子[2]，大田　毅[1]（[1]県立広島大・生命環境，[2]京工繊大・繊科セ）

**4C25a02　リンカー領域にパリンドロームなアミノ酸配列を持った好熱性放線菌由来マンノシダーゼの酵素化学的解析**

**9:35** ○堀江瞳美[1]，松浦愛奈[1]，河合富佐子[2]，大田　毅[1]（[1]県立広島大・生命環境，[2]京工繊大・繊科セ）

**4C25a03　放線菌メタロプロテアーゼ SCMP プロモーターの 5' 領域の欠失はタンパク質生産性の向上をもたらす**

**9:50** ○裏地美杉，万　クン，畑中唯史（岡山生物研）

**4C25a04　タイ産耐熱性メタノール資化酵母 *Ogataea thermomethanolica* BCC16875 のプロテアーゼ遺伝子破壊による組換えタンパク質生産性向上**

**10:05** ○西田真実[1]，大橋貴生[1]，金　達英[1]，Niran ROONGSAWANG[2]，Sutipa TANAPONGPIPAT[2]，藤山和仁[1]（[1]阪大生国セ，[2]タイ王国国立遺伝子生命工学研究センター）

**4C25a05　新奇耐熱性ペルオキシダーゼの探索**

**10:20** ○今井岳志[1]，川本　純[2]，三原久明[3]（[1]兵庫県立工業技術センター，[2]京大化研，[3]立命館大生命科学）

**4C25a06　糸状菌 *Aspergillus aculeatus* 由来糖化アミノ酸オキシダーゼの基質特異性**

**10:35** ○合川菜々子，谷　修治，炭谷順一，川口剛司（阪府大院生環）

**a07〜a10 発表者の接続時間 10:50〜11:00**

**4C25a07　*Streptomyces corchorusii* 由来蛋白性アミラーゼ阻害剤 Paim の阻害特異性に関与する領域の同定**

**11:00** ○渡邉卓弥，谷　修治，炭谷順一，川口剛司（阪府大院生環）

**4C25a08　HAD スーパーファミリーに属するハロ酸デハロゲナーゼのフルオロ酢酸分解活性の比較**

**11:15** ○李　貢順[1]，山田柊人[2]，中村　卓[3]（[1]長浜バイオ大学バイオサイエンス研究科，[2]長浜バイオ大学バイオサイエンス学部，[3]長浜バイオ大学）

**4C25a09　フルオロ酢酸分解活性の向上したハロ酸デハロゲナーゼ L-DEX YL 変異体の量子化学計算によるデザインと 実験による検証(2)**

**11:30** ○福田昌寛[1]，　岩崎静斗[1]，　棚田悠介[1]，　中村　卓[1]，田中成典[2]（[1]長浜バイオ大，[2]神大院）

**4C25a10　*Caenibacillus caldisaponilyticus* B157[T] 株が産生する新規ホスホリパーゼ A の成熟化における C 末端プロペプチドと性質決定**

**11:45** ○齋藤　遼[1]，　古谷洋人[1]，　辻本善之[1]，　鶴岡直樹[2]，茂里　康[2]，渡部邦彦[1]（[1]京府大院生命環境，[2]産総研）

## C26 会場　午前の部（9:20〜12:30）

微生物―物質生産－微生物変換，微生物酵素反応―

**a01〜a06 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**4C26a01　マイトファジー抑制による出芽酵母の細胞質物質生産能力向上**

**9:20** ○森田啓介[1]，　松田史生[1]，　岡本浩二[2]，　石井　純[3]，近藤昭彦[3]，清水　浩[1]（[1]阪大院・情報，[2]阪大院・生命，[3]神戸大院・イノベ）

**4C26a02　核酸医薬原料 2'-*O*-メチルリボヌクレオシド生産に向けた微生物由来ヌクレオシドハイドロラーゼの触媒機能解析**

**9:35** ○光川侑輝[1]，　日比　慎[2]，　松谷成裕[1]，　堀之内伸行[1]，高橋里美[2]，小川　順[1]（[1]京大院・農・応用生命，[2]京大院・農・産業微生物）

**4C26a03　*Bacillus megaterium* F13 株による EPA 酸化代謝物（17,18-EpETE）の生産条件の検討**

**9:50** ○大地健介[1]，　齊藤一輝[1]，　竹内道樹[1,2]，　永野秀昭[2]，岸野重信[1]，小川　順[1]（[1]京大院農・応用生命，[2]京大院農・産業微生物）

**4C26a04　10-hydroxy-octadecanoic acid の酵素的脱水反応における *cis* / *trans* 異性体制御**

**10:05** ○雑賀あずさ，岸野重信，谷　実歩，小川　順（京大院農・応用生命）

**4C26a05　*Chryseobacterium* sp. 5-3B 由来 *N*- アセチルトランスフェラーゼの基質認識部位の探索**

**10:20** ○竹中慎治[1]，　尾関貴博[1]，　田中耕生[2]，　石川　周[3]，吉田健一[3]（[1]神戸大院農，[2]神戸大院自然，[3]神戸大院科学）

**4C26a06　遺伝子組み換え麹菌培養上清カクテルを用いた希少糖高生産プロセスの開発**

**10:35** ○若井　暁[1]，　浅井菜々実[1]，　荻野千秋[2]，　堤　浩子[3]，秦　洋二[3]，松沢智彦[4]，矢追克郎[4]，近藤昭彦[1]（[1]神戸大院イノベ，[2]神戸大院工，[3]月桂冠総研，[4]産総研生物プロセス）

**a07〜a12 発表者の接続時間 10:50〜11:00**

**4C26a07　コリネ型細菌を用いたフェルラ酸からプロトカテク酸の生産**

**11:00** ○岡井直子[1]，　増田敬也[2]，　竹嶋康誠[1]，　田中耕生[3]，吉田健一[1]，宮本正教[2]，荻野千秋[4]，近藤昭彦[1]（[1]神戸大科技，[2]帝人，[3]神戸大自，[4]神戸大院工）

**4C26a08　海洋性テレフタル酸分解菌の分離と分解系遺伝子の解析**

**11:15** ○澤岡良太，岩木宏明，長谷川喜衛（関西大 化学生命工）

**4C26a09　シクロドデカノン分解菌の分離と分解系遺伝子の解析**

**11:30** ○山本泰誠，岩木宏明，長谷川喜衛（関西大化学生命工）

**4C26a10　放線菌 P450 が触媒する新規の分子間カップリング反応の解析**

**11:45** ○勝山菜央，山西健太，岡澤敦司，小川拓水，太田大策（大阪府大）

**4C26a11　タンデム酵素反応を活用したバイオプロセスによる(2*R*)-ヒドロキシアミノ酸の生産**

**12:00** ○間中千尋[1]，　日比　慎[1]，　角田洋輔[2]，　北澤宏明[2]，岸本高英[2]，杉山明生[2]，小園祥子[1]，高橋里美[1]，小川　順[1]（[1]京大院・農，[2]東洋紡）

**4C26a12　インジゴ還元菌の探索及び定量的評価法を用いる機能解析**

**12:15** ○久郷将見[1]，　竹内道樹[2]，　四方田和哉[3]，　阪本鷹行[3]，櫻谷英治[3]，小川　順[1]（[1]京大農・応用生命，[2]京大農・産業微生

物，[3]徳大・生物資産）

## J27 会場　午前の部（9:20〜12:30）

### 環境科学・バイオマス利用―環境汚染物質，その他―

**a01〜a06 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**4J27a01　細菌由来のデアミナーゼ―デハロゲナーゼ融合タンパク質の機能解析**
**9:20** ○佐藤あや華，加藤広海，大坪嘉行，津田雅孝，永田裕二（東北大学・大学院生命科学研究科（院生命科））

**4J27a02　*Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株のゲノム構造解析と環境汚染物質分解能の安定化**
**9:35** ○高　未麗[1]，村澤友紀恵[1]，松村吉信[1,2]（[1]関西大・生命生物工，[2]関西大・ORDIST）

**4J27a03　*Pseudomonas stutzeri* NT-I のセレン酸還元関連遺伝子群の同定と解析**
**9:50** ○黒田真史[1]，櫻井紫乃[1]，山下光雄[2]，池　道彦[1]（[1]阪大院・工，[2]芝浦工大・工）

**4J27a04　Clarithromicin と Levofloxacin の藻類に対する毒性**
**10:05** ○浅香貴啓[1]，川瀬俊吾[2]，清水佑一[2]，新井真子[1]，坂本　亮[1]，長坂征治[1,2,3]（[1]東洋大学 生命科学，[2]東洋大院 生命科学，[3]東洋大学生命環境科学研究センター）

**4J27a05　渡良瀬遊水池から単離された藻類の銅に対する応答評価**
**10:20** ○清水佑一[1]，川瀬俊吾[1]，浅香貴啓[2]，柏田祥策[1,2,3]，長坂征治[1,2,3]（[1]東洋大院生命科学，[2]東洋大生命科学，[3]東洋大学生命環境科学研究センター）

**4J27a06　Study on individual and combine effects of Fluoranthene, Phenanthrene and Mannitol on Marigold**
**10:35** ○Wahdatullah KHPALWAK[1,3]，Sh. M. ABDEL-DAYEM[1,2]，Kazuhiko TAKEDA[1]，Hiroshi SAKUGAWA[1]（[1]Biosph. Sci., Hiroshima Univ. Japan, [2]Fac. of Agri. Kafrelsheikh Univ. Egypt, [3]Fac. of Agri. Nangarhar Univ. Afghanistan）

**a07〜a12 発表者の接続時間 10:50〜11:00**

**4J27a07　大気汚染物質（硫酸，フルオランテン）および紫外線（UV-A）がイチゴ（サチノカ）に及ぼす複合影響評価**
**11:00** ○上野豊碩，佐久川弘（広島大学生物圏科学研究科）

**4J27a08　嫌気性フェナントレン分解菌の単離**
**11:15** ○今西伸政，井上謙吾，渡邊史子（宮大院農）

**4J27a09　ポリヒドロキシアルカン酸分解微生物が化学合成生分解性高分子の環境分解に与える影響**
**11:30** ○鈴木美和，室井文篤，風早潤一朗，石井成明，橘　熊野，粕谷健一（群大院理工）

**4J27a10　SOFIX データベースに基づいた水田の特性解析**
**11:45** ○馬場崇誠，荒木希和子，久保　幹（立命大生命）

**4J27a11　C4D 検出器の現場分析への応用**
**12:00** ○長谷部誉人[1]，植山智紗[1]，吉野将紀[2]，岡部勝美[2]，安保　充[1]（[1]明治大・農，[2]明治大・黒川農場）

**4J27a12　液膜型硝酸イオンセンサーの開発と硝酸イオンのリアルタイムモニタリング**
**12:15** ○中尾英策，白井　理，深尾優子，北隅優希，加納健司（京大院農）

## J28 会場　午前の部（9:20〜12:30）

### 環境科学・バイオマス利用―バイオマス，バイオマス変換，バイオ燃料，バイオ化成品

**a01〜a06 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**4J28a01　木質バイオマスからのベンゼン環を含まない新規有機蛍光物質の生産**
**9:20** ○岩淵範之[1]，坂野　優[1]，砂入道夫[1]，松藤　寛[2]（[1]日大・生資科・応生科，[2]日大・生資科・食生科）

**4J28a02　ベンゼン環を含まない新規有機蛍光物質の非バイオプロセスによる生産**
**9:35** ○坂野優稀[1]，砂入道夫[1]，松藤　寛[2]，岩淵範之[1]（[1]日大・生資科・応生科，[2]日大・生資科・食生科）

**4J28a03　タンパク質－パンクレアチン分解物と 3-MGA の反応により生成する有機蛍光物質について**
**9:50** ○廣川侑美[1]，高野浩樹[1]，関華奈子[1]，坂野優稀[2]，岩淵範之[2]，大槻　崇[1]，松藤　寛[1]（[1]日大生資科食生，[2]日大生資科応生）

**4J28a04　アミンと 3-MGA の反応により生成する有機蛍光物質について**
**10:05** ○松藤　寛[1]，菅原一真[1]，廣川侑美[1]，坂野優稀[2]，岩淵範之[2]，大槻　崇[1]（[1]日大生資科食生，[2]日大生資科応生）

**4J28a05　イオン液体を反応場としたアルカリリグニンの分解と分解生成物の解析**
**10:20** ○橘弘一郎，阿部英喜（理研 CSRS）

**4J28a06　木材腐朽菌の混合培養によるセルロース系原料からのエタノール生産**
**10:35** ○井上瑛絵，安藤広将，堀沢　栄（高知工科大学）

**a07〜a12 発表者の接続時間 10:50〜11:00**

**4J28a07　草本系バイオマス含有リグニン分解酵素産生微生物の新規マンガンペルオキシダーゼ**
**11:00** ○伊藤　龍[1]，山本　亮[2]，倉根隆一郎[1,2]（[1]中部大学大学院，[2]中部大学）

**4J28a08　エリアンサス茎葉の 4 ヶ月バンカーサイロ貯蔵／ RT-CaCCO 処理が原料品質と酵素分解性に及ぼす影響**
**11:15** ○池　正和[1]，趙　鋭[1]，服部育男[2]，加藤直樹[2]，上床修弘[2]，我有　満[2,3]，徳安　健[1]（[1]農研機構・食研，[2]農研機構・九沖研，[3]農研機構・中央農研）

**4J28a09　微粉砕・メタン発酵・高度膜分離による稲わらの利用**
**11:30** ○佐々木建吾[1]，白井智量[2]，柘植陽太[3]，佐々木大介[1]，菊地　淳[2]，近藤昭彦[1]（[1]神戸大・科学技術イノベ，[2]理研・CSRS，[3]金沢大学）

**4J28a10　Characterization of Glutathione-Dependent Enzymes from White Rot Fungi**
**11:45** ○WAN HASNIDAH WAN OSMAN[1,2]，MENG I LIN[1,2]，KEIKO KONDO[1]，TAKASHI NAGATA[1,2]，MASATO KATAHIRA[1,2]（[1]Inst. Adv. Energy, Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. Energy Sci., Kyoto Univ.）

**4J28a11　Heterologous expression of the ligninolytic enzymes from wood rotting fungi and analysis of peroxidase activity, lignin model degradation, and homologous modeling**
**12:00** ○MengI LIN[1,2]，Keiko KONDO[1]，Takashi NAGATA[1,2]，Masato KATAHIRA[1,2]（[1]Inst. Adv. Energy, Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. Energy Sci., Kyoto Univ.）

**4J28a12　各種前処理を施したサトウキビバガスのリグニン構造と酵素糖化効率の比較解析**
**12:15** ○宮本託志[1]，三橋麻子[2]，山村正臣[1]，飛松裕基[1]，鈴木史朗[1]，高田理江[1]，小林良則[2]，梅澤俊明[1,3]（[1]京大生存研，[2]バイオインダストリー協会，[3]京大グローバル生存基盤）

## J29 会場　午前の部（9:20〜12:15）

### 生物科学―糖鎖科学－その他，タンパク質･ペプチド科学－その他，その他―

**a01〜a06 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**4J29a01　マウス抗菌ペプチド cryptdin-4 の変異体を用いた作用機構の解析**
**9:20** ○平峰里菜[1]，久米田博之[1,2]，熊木康裕[1]，菊川峰志[1,2]，出村　誠[1,2]，中村公則[1]，綾部時芳[1]，相沢智康[1,2]（[1]北大院先端生命，[2]北大 GI-CoRE ソフトマター GS）

**4J29a02　SUMO2 変異体ライブラリからの腫瘍壊死因子（TNF-α）親和性分子の選択**
**9:35** ○牧野祥嗣，伊藤春佳，河上佳奈，磯貝泰弘，伊藤伸哉

（富山県大工）

**4J29a03　GABA 受容体 ρ 3 サブユニット細胞外領域の集合状態**
**9:50**　◦安杖圭介，小栗栖太郎（岩手大学）

**4J29a04　ジャガイモ由来抗菌ペプチド snakin-1 の発現系構築**
**10:05**　◦山野めぐみ[1]，クドゥスモハマドルフール[1]，ルミファルハナ[1]，堤　元佐[1]，久米田博之[2,3]，熊木智康[4]，神谷昌克[2]，菊川峰志[1,2,3]，出村　誠[1,2,3]，相沢智康[1,2,3]（[1]北大院生命，[2]北大院先端生命，[3]北大 GI-CoRE ソフトマター GS，[4]北大院理）

**4J29a05　哺乳動物細胞におけるポリシアル酸転移酵素の活性発現制御機構の解析**
**10:20**　◦石原幸奈[1,2]，羽根正弥[1,2]，北島　健[1,2]，佐藤ちひろ[1,2]（[1]名大院・生命農学，[2]名大・生物機能開発利用研究セ）

**4J29a06　肝細胞における N-結合型糖鎖と B 型肝炎ウイルス感染効率の関係性解明**
**10:35**　◦中谷漱志[1]，三﨑　亮[1]，岡本　徹[2]，PRIYAMBADA Surya Agung[2]，大橋貴生[1]，松浦善治[2]，藤山和仁[1]（[1]大阪大学 生物工学国際交流センター 応用微生物学研究室，[2]大阪大学 微生物病研究所 分子ウイルス分野）

**a07〜a11 発表者の接続時間 10:50〜11:00**

**4J29a07　カベオリン-1 の化学合成研究及び細胞膜内ドメインの構造解析**
**11:00**　◦藤本梨菜，武居俊樹，朝比奈雄也，佐藤　毅，北條裕信（阪大蛋白研）

**4J29a08　セロビオース構造を含む分岐オリゴ糖の酵素合成とその腸内細菌叢へ与える影響**
**11:15**　◦志村洋一郎，　石山美穂，　加藤朋子，　田村佳奈，水野善則，安達隆史，阿部友美，福島　淳，稲元民夫（秋田県大生資）

**4J29a09　単一チャネル電流の解析によるグラミシジン A チャネルのイオン透過機構の解明**
**11:30**　◦白井　理，山口拓也，北隅優希，加納健司（京大院農）

**4J29a10　全アミノ酸スキャニング変異導入法と無細胞タンパク質合成系を用いた耐熱化 MMLV 逆転写酵素スクリーニング系の構築**
**11:45**　◦李　暐陽[1]，　片野裕太[2]，　中村実世[1]，　馬場美聡[2]，伊東昌章[3]，滝田禎亮[1,2]，保川　清[1,2]（[1]京大農，[2]京大院農，[3]沖縄高専）

**4J29a11　グリコサミノグリカンの輸送に関わる細菌由来基質結合タンパク質のドメインダイナミクス**
**12:00**　◦老木紗予子[1]，　蒲地玲子[2]，　三上文三[1,2]，　村田幸作[3]，橋本　渉[1,2]（[1]京大院・農，[2]京大・農，[3]摂南大・理工）

## J30 会場　午前の部（9:20〜12:15）

生物科学―生物工学－その他―

**a01〜a06 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**4J30a01　ナノ粒子表面の局所表面プラズモン共鳴効果を用いたウイルスの高感度・迅速検出とその汎用性の検討**
**9:20**　◦竹村謙信[1]，　オルワセサンアデゴケ[2]，　加藤竜也[1,2]，鈴木哲朗[3]，朴　龍洙[1,2]（[1]静岡大院・総合科技研・農学専攻・応生化，[2]静大グリーン科技研，[3]浜医大・医・医学科）

**4J30a02　CdZnSeS 量子ドット-分子ビーコンナノバイオセンサーを用いたノロウイルスの高感度検出法**
**9:35**　◦森田真広[1]，　アデゴケオルワセサン[2]，　加藤竜也[1,2]，朴　龍洙[1,2]（[1]静大農　応生化，[2]静大　グリーン科技研）

**4J30a03　金ナノ粒子の堆積により形成された膜を用いたウイルスの高感度免疫蛍光速検出**
**9:50**　◦朴　龍洙[1]，　アーメドシェドラヒン[1]，　キムジョンヒョ[2]，トランヴァンタン[2]，リジェボン[2]，鈴木哲朗[3]（[1]静大・グリーン科技研，[2]釜山大・ナノ融合工，[3]浜医大・医・医学科）

**4J30a04　亜リン酸を用いた新規生物学的封じ込め手法の開発**
**10:05**　◦廣田隆一[1,2]，　桂浦善一郎[1]，　野口麗次[1]，　森部重彬[1]，舟橋久景[1]，池田　丈[1]，黒田章夫[1,2]（[1]広大先端研，[2]JST-ALCA）

**4J30a05　亜リン酸要求性大腸菌の生物学的封じ込め効果と増殖特性解析**
**10:20**　◦桂浦善一朗[1]，　廣田隆一[1,2]，　船橋久景[1]，　池田　丈[1]，黒田章夫[1,2]（[1]広大院・先端研，[2]JST-ALCA）

**4J30a06　正のフィードバック遺伝回路を用いて厳密に遺伝子の発現を制御する方法**
**10:35**　◦加藤祐輔（農研機構・生物機能）

**a07〜a11 発表者の接続時間 10:50〜11:00**

**4J30a07　*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus を用いた哺乳動物細胞への外来遺伝子導入**
**11:00**　◦加藤竜也[1,2]，杉岡沙紀[1]，板垣滉平[1]，朴　龍洙[1,2]（[1]静岡大農，[2]静岡大グリーン科技研）

**4J30a08　カイコ-BmNPV バクミド発現系による MERS-CoV の組換え S タンパクの発現と精製**
**11:15**　◦高見佳宏，ビピンクマールデオ，加藤竜也，朴　龍洙（静大農・応生化）

**4J30a09　カイコ-BmNPV バクミド系で発現させた熱帯熱マラリア原虫抗原の解析**
**11:30**　◦稲垣　裕[1]，宮崎剛亜[1,2]，加藤竜也[1,2]，朴　龍洙[1,2]（[1]静大院・農・応生化，[2]静大グリーン科技研）

**4J30a10　抗体を整列固定化する平面膜の開発**
**11:45**　◦飯嶋益巳，黒田俊一（阪大・産研）

**4J30a11　pVEC 関連ペプチドの構造と植物細胞透過性の関係**
**12:00**　◦林　真由，宮下正弘，宮川　恒（京大農）

## J31 会場　午前の部（9:20〜12:30）

植物―植物栄養，光合成，オルガネラ，膜輸送―

**a01〜a06 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**4J31a01　野生イネにおけるファイトアレキシン生合成遺伝子クラスター領域の転写動態とその制御因子の進化**
**9:20**　◦冨山詩歩[1]，　川原玲香[2]，　宮本皓司[3]，　山根久和[3]，Shenton Matthew[4]，倉田のり[4]，豊増知伸[5]，野尻秀昭[1]，岡田憲典[1]（[1]東大生物工学セ，[2]東農大ゲノムセ，[3]帝京大バイオ，[4]遺伝研，[5]山形大農）

**4J31a02　イネのジテルペン型ファイトアレキシン生産における OsbZIP79 を介した転写抑制機構の解析**
**9:35**　◦渋谷大地[1]，宮本皓司[2]，山根久和[2]，岡田憲典[1]，野尻秀昭[1]（[1]東大・生セ，[2]帝京大・理工）

**4J31a03　イネのジテルペン型ファイトアレキシン生産制御因子 DPF のジャスモン酸による発現誘導機構と細胞内挙動**
**9:50**　◦田渕雄夢[1]，　堤　涼[1]，　根本圭一郎[2]，　澤崎達也[2]，森　昌樹[3]，　宮本皓司[4]，　山根久和[4]，　光田展隆[5]，　野尻秀昭[1]，岡田憲典[1]（[1]東大・生物工学セ，[2]愛媛大・工，[3]農研機構・生物機能利用，[4]帝京大・バイオ，[5]産業技術総合研究所）

**4J31a04　bZIP 型転写因子 OsTGAP1 によるジテルペン型ファイトアレキシン生産制御機構の解明**
**10:05**　◦吉田悠里[1]，　宮本皓司[2]，　山根久和[2]，　野尻秀昭[1]，岡田憲典[1]（[1]東大・生物工学セ，[2]帝京大・バイオ）

**4J31a05　アーキアに発見した光合成カルビンサイクルの進化的原型**
**10:20**　◦河野卓成[1,2]，　Sandhya Mehrotra[3]，　遠藤千夏子[2]，松田真実[4]，　木村浩之[5]，　蓮沼誠久[4]，　横田明穂[2]，　松村浩由[6]，蘆田弘樹[1]（[1]神戸大院・人間発達環境，[2]奈良先端大・バイオ，[3]BITS　Pilani，[4]神戸大院・科学技術イノベーション，[5]静岡大・グリーン科学技術，[6]立命館大院・生命科学）

**4J31a06　オーストラリアシャジクモにおける単一細胞内代謝物動態解析**
**10:35**　◦奥田安美[1]，　寺嶋　傑[1]，　佐々木亮介[2]，　三村徹郎[3]，斉藤和季[2,4]，及川　彰[1,2]（[1]山形大農，[2]理研 CSRS，[3]神戸大院理，[4]千葉大院薬）

**a07〜a12 発表者の接続時間 10:50〜11:00**

**4J31a07　シロイヌナズナ液胞タンパク質受容体の輸送モチーフの**

変異による液胞タンパク質輸送の影響
**11:00** ○高畑周平[1]，松波絵里香[1]，清水英寿[2]，地阪光生[2]，横田一成[2]，中川 強[1]，西村浩二[1]（[1]島根大・総科セ・遺伝子，[2]島根大・生物資源）

**4J31a08 シロイヌナズナ PAMP 受容体の膜輸送小胞への選別機構に関する研究**
**11:15** ○塚本真嗣[1]，常 愛花[2]，清水英寿[2]，地阪光生[2]，横田一成[2]，中川 強[1]，西村浩二[1]（[1]島根大・総科セ・遺伝子，[2]島根大・生物資源）

**4J31a09 シロイヌナズナブラシノステロイド受容体 AtBRI1 とクラスリン AP2 複合体との相互作用解析**
**11:30** ○吉田昇平[1]，清水英寿[2]，地阪光生[2]，横田一成[2]，中川 強[1]，西村浩二[1]（[1]島根大・総科セ・遺伝子，[2]島根大・生物資源）

**4J31a10 微生物資材の植物への作用機作の研究**
**11:45** ○西片百合[1]，荒城 新[1]，松崎雅広[2]，安保 充[1]（[1]明大農，[2]鈴峯女子短期大学保育学科）

**4J31a11 コウキクサ細胞壁に含まれるホウ素結合多糖に関する研究**
**12:00** ○中野耕太[1]，桑木信輔[1]，小林 優[1]，間藤 徹[1]，伊藤照悟[2]，小山時隆[2]（[1]京大農，[2]京大理）

**4J31a12 シロイヌナズナにおけるホウ素欠乏初期応答の解析**
**12:15** ○小林 優[1]，宮本真亜子[1]，間藤 徹[1]，北島佐紀人[2]，花野 滋[3]，イニョマンスメルタ[4]，櫻井 望[3]，柴田大輔[3]（[1]京大農，[2]京都工繊大工芸科学，[3]かずさ DNA 研，[4]インドネシア科学院）

## J32 会場 午前の部（9:20〜12:30）

植物―環境応答，ストレス応答，情報伝達，分化，その他―

**a01〜a06 発表者の接続時間 9:10〜9:20**

**4J32a01 高温登熟乳白部位特異的プロテオーム解析**
**9:20** ○金古堅太郎[1]，佐々木麻衣子[1]，佐藤友紀[2]，椎名将平[2]，三ツ井敏明[1,2]（[1]新潟大院・自然科学，[2]新潟大・農）

**4J32a02 酒米における白濁化メカニズムの解明：走査型電子顕微鏡による解析**
**9:35** ○椎名将平[1]，栗林なな子[2]，金古堅太郎[2]，三ツ井敏明[1,2]（[1]新潟大農・応生化，[2]新潟大院・自然科学）

**4J32a03 スサビノリ葉状体の脱水耐性関連候補タンパク質群の同定**
**9:50** ○山口健一[1,2]，久留崇寛[1,3]，尾島 佑[1]，脇山貴文[1]，島 祐理[1]，山岡拓也[1]，山倉那央[1,2]，三輪泰彦[4]，桑野和可[1,2]，小田達也[1,2]（[1]長大水，[2]長大院水環，[3]長総大付属，[4]福山大生命工）

**4J32a04 冠水ストレス応答性転写因子 AP2ERF(VII)-1 を導入したダイズの作製と冠水耐性の評価**
**10:05** ○西澤けいと，小松節子（農研機構・次世代作物開発研究センター）

**4J32a05 収穫時の環境条件がダダチャマメの代謝成分に与える影響**
**10:20** ○堀部大和[1]，竹内勝隆[1]，森田 渓[1]，清水康貴[1]，佐々木亮介[2]，斉藤和季[2,3]，及川 彰[1,2]（[1]山形大農，[2]理研 CSRS，[3]千葉大院薬）

**4J32a06 オカボノアカアブラムシのイネ根への寄生によるアミノ酸の蓄積**
**10:35** ○手林慎一[1]，及川 彰[2]，佐々木亮介[3]，斉藤和季[3]，間世田英明[4]，上手麻希[4]，石原 亨[5]（[1]高知大農，[2]山形大農，[3]理研，[4]徳島大 STS，[5]鳥取大農）

**a07〜a12 発表者の接続時間 10:50〜11:00**

**4J32a07 ナンテン由来ヒドロキシニトリルリアーゼの精製と諸性質の解明**
**11:00** ○北川あすか[1]，金森一馬[1]，柏木 望[1]，松井大亮[1,2]，仙波 尚[3]，礒部公安[1,2]，浅野泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ，[2]JST, ERATO，[3]株式会社日本触媒）

**4J32a08 シロイヌナズナ NADH 加水分解酵素(AtNUDX6)による生物的ストレス応答制御に関与する相互作用因子の同定と機能解析**
**11:15** ○吉村和也[1]，中川奨也[2]，小川貴央[3]，田部記章[4]，田茂井政宏[2,4]，重岡 成[2,4]（[1]中部大応生食栄，[2]近畿大院農バイオ，[3]島根大生資科生命工，[4]近畿大農バイオ）

**4J32a09 シロイヌナズナ bHLH11 は鉄ホメオスタシス制御における転写制御因子として機能する**
**11:30** ○野志昌弘[1]，森 大輔[2]，田部記章[1]，田茂井政宏[1,2]，高木 優[3,4]，重岡 成[1,2]（[1]近畿大・農・バイオ，[2]近畿大院・農・バイオ，[3]産総研・生物プロセス，[4]埼玉大・環境科学）

**4J32a10 ウリ科植物が持つ汚染物質輸送因子のストレス応答への関与**
**11:45** ○礒野絵梨香[1]，足助聡一郎[1]，土佐幸雄[1]，乾 秀之[1,2]（[1]神戸大院農，[2]神戸大バイオ）

**4J32a11 モノデヒドロアスコルビン酸レダクターゼの電子供与体 NADH から NADPH への特異性の変換**
**12:00** ○溝口洋和，高野和文，佐野 智（京都府立大院 生命環境）

**4J32a12 ウマノスズクサにおけるアリストロキア酸生合成酵素遺伝子の探索と機能同定**
**12:15** ○松井俊樹，堀健太郎，山田泰之，佐藤文彦（京大院・生命）

## J33 会場 午前の部（9:35〜12:00）

酵素―その他―

**a02〜a06 発表者の接続時間 9:25〜9:35**

**4J33a02 基質認識メカニズム解明を目指したリゾプラズマローゲン特異的ホスホリパーゼ D の部位特異的変異導入解析**
**9:35** ○小山貴之[1]，谷中田昌彦[1]，酒瀬川信一[2]，村山和隆[3]，杉森大助[1]（[1]福島大理工，[2]旭化成ファーマ，[3]東北大院医工）

**4J33a03 酵母由来 Urethanase の精製及び性質検討**
**9:50** ○水呉太一[1]，柿薗ダララット[2]，藤原可菜子[1]，向井伸彦[2]，藤井 力[2]，正木和夫[3]（[1]広島大生物圏，[2]酒類総合研究所，[3]岐阜県産業技術センター）

**4J33a04 海洋性細菌 *Shewanella* 属細菌の生産するポリエステル分解酵素の構造と機能**
**10:05** ○岸田真季，宋 君哲，橘 熊野，粕谷健一（群大理工）

**4J33a05 中温性 *Bacillus pumilus* 由来脂肪族芳香族ポリエステル分解酵素の特徴づけ**
**10:20** ○SOULENTHONE Phouvilay，室井文篤，橘 熊野，山本桐子，水野 司，粕谷健一（群大理工）

**4J33a06 酵素的結晶変換法を用いた物質生産技術の開発**
**10:35** ○山本和範[1,2]，荒木通啓[3]，浅野泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ，[2]JST, ERATO，[3]神大院・科技イノ）

**a07〜a10 発表者の接続時間 10:50〜11:00**

**4J33a07 好塩性古細菌およびシアノバクテリアに保存された新規ビオチン生合成酵素の機能解析**
**11:00** ○大石恵太[1]，清水 哲[1]，小林一幾[2]，富田武郎[1]，田中 寛[2]，葛山智久[1]，西山 真[1]（[1]東大・生物工学セ，[2]東工大・化学生命科学研究所）

**4J33a08 本来の産生菌 *Sphingobium fuliginis* を用いた改良型変異 Organophosphorus hydrolase の産生**
**11:15** ○石川暁志[1]，岩田なつみ[1]，有路沙織[1]，浅野直樹[1]，大森 毅[2]，瀬戸康雄[2]，川原一芳[1]（[1]関東学院大学，[2]科学警察研究所）

**4J33a09 *Thermus thermophilus* HB27 株由来分岐鎖ポリアミン合成酵素の構造と機能**
**11:30** ○秀瀬涼太[1]，ウィハルドジャギタ[1]，豊田真孝[2]，溝端栄一[2]，井上 豪[2]，藤原伸介[1]（[1]関学大理工，[2]阪大工）

**4J33a10 ピロリン酸依存性リン酸化酵素の基質認識機構の解明**
**11:45** ○永田隆平[1]，藤橋雅宏[1]，佐藤喬章[2]，跡見晴幸[2]，三木邦夫[1]（[1]京大院理，[2]京大院工）

## J34 会場　午前の部（9:50〜12:00）

酵素―核酸代謝関連酵素―

**a03〜a06 発表者の接続時間 9:40〜9:50**

**4J34a03　Identification of a novel guanosine 5'-monophosphate reductase from pathogenic protozoa *Trypanosoma congolense***
**9:50**　◦Albertus SARWONO[1], Keisuke SUGANUMA[2,3], Shinya MITSUHASHI[1], Tadashi OKADA[2,4], Simon Peter MUSINGUZI[2], Kengo SHIGETOMI[1], Noboru INOUE[5], Makoto UBUKATA[1]（[1]Graduate School of Agriculture, Hokkaido Univ., [2]National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro Univ. of Agr. and Vet. Med., [3]Research Center for Global Agromedicine, Obihiro Univ. of Agr. and Vet. Med., [4]Faculty of Medicine, Univ. of Miyazaki, [5]Obihiro Univ. of Agr. and Vet. Med.）

**4J34a04　超好熱古細菌 *Methanopyrus kandleri* 由来 Endonuclease III の機能解析**
**10:05**　◦上松　敦，志田敏夫（信大院繊・応生）

**4J34a05　結核菌由来 diadenosine tetraphosphate 加リン酸分解酵素の新規阻害剤と抗結核菌活性**
**10:20**　◦森茂太郎，本田尚子，金　　玄，林原絵美子，柴山恵吾（感染研）

**4J34a06　高度好塩菌 *Haloarcula japonica* 由来 2-デオキシリボース 5-リン酸アルドラーゼに関する研究**
**10:35**　◦大志田達也[1]，　林　順司[1]，　里村武範[2]，　川上竜巳[3]，大島敏久[4]，櫻庭春彦[1]（[1]香川大農，[2]福井大工，[3]徳島大生物資源，[4]大工大工）

**a07〜a10 発表者の接続時間 10:50〜11:00**

**4J34a07　組換えヒト nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase 1（NMNAT1）の調製，諸性質および逆反応を利用した NMN 製造の試み**
**11:00**　◦小根田洋史（長田産業）

**4J34a08　超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* 由来ヘリカーゼの PCR 反応への影響**
**11:15**　◦川戸克展[1]，秀瀬涼太[1]，藤原綾子[1]，保川　清[2]，藤原伸介[1,3]（[1]関学大理工，[2]京大農，[3]関学大生物機能基材研究開発セ）

**4J34a09　*Rhodococcus rhodochrous* J1 株にコードされている Vsr エンドヌクレアーゼの生化学的性質**
**11:30**　◦加茂貴宏，大内優彦，喜多恵子（京大院農）

**4J34a10　組換え *Flavobacterium psychrophilum* コラゲナーゼの発現**
**11:45**　◦森下　諒[1]，　森真璃子[2]，　中山仁志[3]，　田中啓友[4]，服部俊治[4]，滝田禎亮[1,2]，保川　清[1,2]（[1]京大農，[2]京大院農，[3]和歌山県水産試験場，[4]㈱ニッピ）

講演番号：2A01a01
講演日時：3 月 18 日 09:20～ A 校舎 01 会場

Study on the sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-binding sites in the WD40 domain of SREBP cleavage-activating protein (SCAP)

○YEN-CHOU KUAN, MAKOTO SHIMIZU, JUN INOUE, RYUICHIRO SATO (The Univ. of Tokyo)

Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) are the key transcription factors that modulate lipid biosynthesis. SREBPs are synthesized on the ER membrane as inactive precursors. Upon synthesis, SREBP binds to the C-terminal WD40 domain of its chaperone, SREBP cleavage-activating protein (SCAP). SCAP stabilizes SREBP from rapid degradation and facilitates the transport of SREBP to the Golgi apparatus for proteolytic activation. Therefore, SCAP/SREBP interaction is crucial for SREBP function and the maintenance of lipid homeostasis. However, the molecular detail of the interaction between SCAP and SREBP is obscured. In this study, we investigated the SREBP-binding domain and amino acid residues in SCAP by overexpressing FLAG-tagged human SCAP mutants in HEK293 cells followed by immunoprecipitation experiments. We present here the data showing that SREBP interacts with R984, K1018, R1019, H1118, D1162, L1178, R1187, and R1248 residues in the WD40 domain of SCAP. We also show that all WD40 repeats in the SCAP WD40 domain contributed partially to SREBP-binding. Hence, we propose that SREBP interacts with SCAP WD40 domain on a surface formed by at least 8 core amino acid residues identified in this study. These results provide further knowledge as to SCAP/SREBP interaction and the control of SREBP activities.

sterol regulatory element-binding protein, SREBP cleavage-activating protein, WD40 domain

発表責任者：官 彦州（yenchou.kuan@gmail.com）

講演番号：2A01a02
講演日時：3 月 18 日 09:35～ A 校舎 01 会場

# 脂質とタンパク質の消費バランスを制御する生理機構

# Physiological regulation of balance between fat and protein consumption

○清水 宣明、田中 廣壽（東大医科研）
○Noriaki SHIMIZU, Hirotoshi TANAKA (IMS, Univ. Tokyo)

エネルギー代謝制御は生命維持の根幹をなす。哺乳類などの高等動物は、体内に備蓄した糖質、脂質、タンパク質等の栄養素を必要に応じてエネルギーに変換して利用し、ある程度の絶食に耐えながら次の摂食機会にむけて行動を維持することができる。脂質は単位重量あたりの備蓄熱量においてその他の栄養素より優れており、主に末梢脂肪組織に貯蔵される。タンパク質の最大の貯蔵庫は骨格筋で、筋線維タンパク質は、備蓄栄養素であるとともに、筋収縮による運動と姿勢維持を担っている。従って、個体がおかれた状況に応じて、どの備蓄栄養素をどれだけ消費するかを制御する生理機構、すなわち Fuel choice システムは、動物個体の行動と生存に適した体組成の維持に必須であると考えられる。一方、肥満症、生活習慣病において、脂質の異常蓄積、耐糖能異常のほか、骨格筋萎縮（筋線維タンパク質量の異常減少による筋力低下）などが観察されることから、例えば過剰な栄養摂取が続いた状況下では、ゲノミック、エピゲノミックにプログラムされている Fuel choice システムは必ずしも個体の行動と生存に適したエネルギー代謝に貢献できないともいえる。

空腹時などに中枢神経系からのシグナルを受けて副腎皮質から分泌されるグルココルチコイドは、骨格筋においてグルココルチコイド受容体（GR）を活性化する。その結果、タンパク質分解系の遺伝子群の発現が誘導され、筋線維タンパク質がアミノ酸に分解される。アミノ酸は異化過程においてエネルギー産生の基質となり、とくにアラニンは肝臓へ輸送されてグルコースに変換され、血糖維持にも貢献する。我々は、骨格筋特異的に GR をノックアウトすることで、タンパク質をエネルギー産生の基質として利用する生理機構を抑制したモデルマウス（mGRKO マウス）を構築した。予測どおり、mGRKO マウス骨格筋におけるタンパク質分解系遺伝子群の発現誘導は抑制されており、血漿中のアラニン濃度は低下していた。mGRKO マウスは、骨格筋が肥大する一方で全身の脂肪組織が縮小していた。mGRKO マウスでは、脂肪組織でトリグリセリド分解を促進するヘパトカイン FGF21 の血漿濃度が増加しており、これが脂質代謝亢進、脂肪組織縮小の機構と考えられた。初代培養肝細胞を利用した検討などにより、肝細胞における *FGF21* の遺伝子転写にアラニンが抑制性に働くことがわかり、骨格筋からのアラニン供給が肝細胞における *FGF21* 遺伝子転写調節を介して、脂肪組織の脂質代謝を制御するという、新たなシグナル伝達軸の存在が明らかとなった。この骨格筋 −（アラニン）−肝臓 −（FGF21）−脂肪組織の連携によるエネルギーフローの生理的制御機構は、肥満をはじめとする生活習慣病に対する新たな予防治療法の標的になりうると考えられる。

glucocorticoid, obesity, metabolism

発表責任者：清水宣明（nshimizu@ims.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A01a03
講演日時：3 月 18 日 09:50～ A 校舎 01 会場

SMXA5 マウスの食餌誘導性脂肪肝の形成機構の解析
The mechanism of a diet-induced fatty liver development in SMXA5 mouse
○金森 深作、小林 美里、鈴木 京、村井 篤嗣、堀尾 文彦（名大農）
○Shinsaku KANAMORI, Misato KOBAYASHI, Miyako SUZUKI, Atushi MURAI, Humihiko HORIO (Nagoya Univ.)

【背景・目的】脂肪肝は 2 型糖尿病や脂質代謝異常症などの、生活習慣病と密接に関わっており、肝硬変や肝がんに発展する危険性がある。当研究室では脂肪肝抵抗性マウスである SM/J と A/J マウスから作出されたリコンビナント・インブレッドの 1 系統の SMXA5 マウスが高脂肪食誘導性の 2 型糖尿病と脂肪肝に感受性であることを見出した。今までに、この SMXA5 マウスの遺伝解析により第 2、12、17 番染色体上に脂肪肝感受性遺伝子座を報告しており、責任遺伝子の同定を目指している。本研究では脂肪肝感受性責任遺伝子の同定を進めるために SMXA5 マウスの糖、脂質代謝に関する表現型解析を行い、脂肪肝発症のメカニズムを明らかにすることを目的とした。
【方法】雄性の A/J、SM/J、SMXA5 マウスを 6 週齢から高脂肪食で 11 週間飼育した。体重、血糖値、血中トリグリセリド（TG）濃度を経時的に測定し飼育後、組織を採取した。採取した肝臓、精巣上体脂肪での遺伝子発現量を測定した。
【結果・考察】SMXA5 マウスの肥満度は A/J、SM/J マウスに比べて大きく、解剖時の血糖値、血中 TG 値は高値を示し、また耐糖能の低下および血中インスリン濃度の高値を示したことから、インスリン抵抗性を発症していると考えられた。SMXA5 マウスの肝臓重量は A/J、SM/J マウスと比較して高値を示し、精巣上体脂肪重量は低値を示した。SMXA5 の肝臓 TG 含量、肝臓総脂質含量は有意な高値を示し脂肪肝を呈した。
肝臓では *Pparγ* の mRNA レベルが有意に高く、その標的遺伝子である脂肪酸取り込みや TG 合成系の遺伝子の mRNA レベルが上昇した。一方、精巣上体脂肪での *Pparγ* の mRNA レベルは SMXA5 マウスで有意な低値を示し、TG 合成系遺伝子の発現量の低下が確認された。また、SMXA5 マウスの精巣上体脂肪では炎症マーカーと線維化マーカーの mRNA レベルが高値を示したことから脂肪細胞での炎症誘導が肝臓への異所性脂肪蓄積を引き起こした可能性が考えられた。
以上のことから、SMXA5 の脂肪肝形成には肝臓の *Pparγ* の発現上昇による TG 合成の増加に加えて、脂肪組織での *Pparγ* 発現低下および炎症誘導が寄与していると考えられた。

fatty liver, Pparγ, epididymal fat

発表責任者：小林美里（misatok@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2A01a04
講演日時：3 月 18 日 10:05～ A 校舎 01 会場

膵β細胞増殖におよぼすアンドロゲンの作用と高グルコースによる影響について
Effects of androgen on pancreatic β-cell growth under low and high glucose conditions
○原田 直樹[1]、乾 博[2]、山地 亮一[1]([1]大阪府大生命環境、[2]大阪府大栄養)
○Naoki HARADA[1], Hiroshi INUI[2], Ryoichi YAMAJI[1] ([1]Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Nutr., Osaka Pref. Univ.)

【背景・目的】膵臓β細胞は、血糖値の上昇を感知してインスリンを分泌することで血糖値の恒常性維持に寄与する。2型糖尿病の予防にはβ細胞量を発達させて維持することが重要となる。2型糖尿病発症により高血糖状態が持続することは、β細胞量を低下させる糖毒性を生じさせ、糖尿病はより一層悪化する。一方、男性では血中テストステロン値が低いことが2型糖尿病発症のリスクを上昇させることから、糖代謝における男性ホルモンの重要性が近年注目されている。本研究では、ラットβ細胞の発達におけるアンドロゲンの作用について検討し、さらに、β細胞株を用いてアンドロゲン受容体（AR）を介した男性ホルモンシグナルがβ細胞の増殖におよぼす影響とβ細胞におけるアンドロゲンシグナリングに対する高血糖の影響について検討した。
【方法・結果】8週齢雄性ラットβ細胞におけるARの発現を組織染色により検討した結果、ARはβ細胞の核に存在することが明らかとなった。6週齢の雄性ラットを去勢後、16週齢まで飼育した。β細胞量は去勢により3割程度まで減少したが、テストステロンの投与によって完全に回復した。テストステロンによるβ細胞量の調節は、膵島の数とβ細胞クラスターサイズの両方に起因することが判明した。増殖マーカーであるKi67陽性のβ細胞の割合は、β細胞量と同様に去勢により3割にまで減少し、テストステロンの投与によって完全に回復した。β細胞株であるINS-1細胞とINS-1 #6細胞（AR高発現株）の増殖におよぼすテストステロンの影響を検討した結果、テストステロンはβ細胞株の増殖を促進した。ARのノックダウンやARアンタゴニストはテストステロンによる増殖促進効果を消失させた。さらに、テストステロンによるβ細胞増殖作用は、高グルコース濃度下（22.2 mM）や高ピルビン酸存在下（50 mM）で消失した。高グルコースや高ピルビン酸存在下では、ARタンパク質レベルが減少した。高グルコースにおいて、AR mRNA量は変化しなかった。一方、ARタンパク質の減少は、ユビキチン-プロテアソーム阻害剤であるMG132の存在下やカルシウムキレート剤であるBAPTA-AMによって抑制された。カルシウムイオノフォア（A23187）によってもARタンパク質は減少し、MG132によりこの減少は阻害された。また、高グルコース下で分泌されるインスリンは、ARタンパク質レベルに影響しなかった。これらの結果から、アンドロゲンシグナリングは、β細胞の増殖を亢進させることでβ細胞量を調節することが明らかになった。さらに、高グルコース環境下ではARタンパク質がカルシウムシグナルの亢進に関連してユビキチン-プロテアソーム系により分解され、テストステロンのβ細胞増殖促進作用が減弱することが示唆された。

androgen receptor, pancreatic β-cells

発表責任者：原田直樹（harada@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：2A01a05
講演日時：3 月 18 日 10:20～ A 校舎 01 会場

# 日本食摂取がヒト腸内細菌叢に与える影響

# The effect of the traditional Japanese diet on the human gut microbiota

○串田 衛、菅原 沙恵子、浅野 将希、都築 毅 (東北大院農)
○Mamoru KUSHIDA, Saeko SUGAWARA, Masaki ASANO, Tsuyoshi TSUDUKI (Grad. Sch. of Agric. Sci., Tohoku Univ.)

【背景・目的】我々の最近の研究により、様々な年代（1960 年、1975 年、1990 年、2005 年）の日本食をマウスに与えたところ、1975 年日本食が最も健康有益性が高いことが明らかになった [1-3]。さらに、この知見をもとに行ったヒト試験においても、現代食に比べて、1975 年の特徴を有する食事は、BMI の低下など有益な効果を示した。1975 年日本食の健康有益性が高い理由の一つとして、食材の多様性、特に味噌、醤油、納豆などの発酵食品の摂取の多さが挙げられる。発酵大豆食品の摂取に関しては、腸内の Lactobacillus 属や、Bifidobacterium 属などの、健康に有益とされている菌の増加と、大腸菌群や Clostridium perfringens などの健康を害する菌の減少が報告されており、発酵食品が腸内細菌叢に様々な影響を与えることが明らかとなっている。近年、腸内細菌叢の構成が様々な要因（宿主の遺伝子的素因や過度の外的環境変化） により破綻すると、腸内感染防御能の低下、炎症性腸疾患や大腸がんといった腸管関連疾患だけでなく、肥満や糖尿病、アレルギー、自閉症、脂肪肝、肝がん、多発性硬化症など腸以外の様々な疾患にまで影響することが明らかになり、腸内細菌叢を制御することで様々な疾患を予防できることが示唆されている。以上のことを踏まえ本研究では、1975 年型日本食の有益性の要因の一つに、腸内細菌叢が関与しているかどうかを、1975 年型日本食と現代型日本食を摂取したヒトの腸内細菌叢の変化に着目することで明らかにしようとした。
【方法・結果】軽度肥満者 60 名を 30 名ずつ 2 群に分け、1975 年型日本食及び現代食を 4 週間摂取させた。摂取前後の被験者の糞便サンプルについてメタ 16S 解析を行い、1975 年型日本食を摂取した被験者と現代食を摂取した被験者の腸内細菌叢の変化を比較した。その結果 Bacteroidetes 門において 1975 年型日本食摂取でその割合が増加した一方、現代食摂取では減少した。Firmicutes 門においては、1975 年型日本食摂取でその割合が減少した一方、現代食摂取で増加した。さらに属レベルの解析において Clostridium 属の菌の減少が 1975 年型日本食摂取において見られた。また、肥満患者で高い存在率を示すことが知られている Collinsella 属は現代食摂取によって発現が増加した。以上より、1975 年型日本食の摂取は軽度肥満者の腸内細菌叢に対して良い影響を与え、健康の増進に役立つ可能性が示唆された。

[1] T. Honma, T. Tsuduki, et al., Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, 60, 541-553 (2013).
[2] Y. Kitano, T. Tsuduki, et al., J Jpn Soc Nutr Sci, 2, 73-85 (2014).
[3] K. Yamamoto, T. Tsuduki, et al., Nutrition, 32, 122-128 (2016).

Japanese diet, gut microbiota, intestinal flora

講演番号：2A01a06
講演日時：3 月 18 日 10:45～ A 校舎 01 会場

# A 型 CpG オリゴ DNA による血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼの活性化と LPS 誘導性ショックの抑制効果

# Type-A CpG oligodeoxynucleotide suppresses LPS-induced shock via activation of platelet activating factor acetylhydrolase

○山本 祥也[1,2]、荻田 佑[3]、下里 剛士[4]([1]信州大院・総合工、[2]学振（DC2)、[3]信州大・バイオメディカル研、[4]菌類・微生物セ)
○Yoshinari YAMAMOTO[1,2], Tasuku OGITA[3], Takeshi SHIMOSATO[4] ([1]Grad. Sch. Sci. Tech., Shinshu Univ., [2]JSPS, [3]IBS, [4]CFMD)

【背景】CpG オリゴ DNA（CpG-ODN）は、感染症・アレルギー・ガンおよび炎症性疾患など、疾病の予防や軽減効果が期待される機能性核酸素材である。CpG-ODN は、シトシン（C）とグアニン（G）の連続配列を有し、その側鎖の塩基を含めた組み合わせにより A, B, C の 3 タイプに分類され、多彩な免疫効果を発揮することが知られている。我々の研究グループでは、ODN による敗血症の制御を目指し、炎症応答および血液凝固を誘導する血小板活性化因子（PAF）やその分解酵素である PAF-Acetylhydrolase（PAF-AH）に注目している。本研究では、PAF-AH を制御する CpG-ODN のスクリーニングを細胞培養試験により行った。また、強い PAF-AH 活性の誘導が認められた A 型 CpG-ODN を用いて、リポ多糖（LPS）により誘導されるエンドトキシンショック（敗血症モデル）に対する CpG-ODN の作用効果について、動物試験により検証した。
【方法】BALB/c（8 週齢, ♀）マウスより脾臓細胞を調製し、3μM の各種 CpG-ODN で処理した。24 時間培養後、paf-ah2 mRNA 発現量について、定量的 PCR 法により解析した。また、PAF-AH 活性については、PAF Acetylhydrolase Assay Kit を用いて測定した。続いて、BALB/c（8 週齢, ♀）マウスに、致死量の LPS を腹腔内投与（i.p.）することで、LPS 誘導性ショックを誘導した。誘導後 3 時間ごと、生存観測と直腸温の測定を行った。同マウスを用いて、LPS 投与の 3 時間前に、300μg の A 型 CpG-ODN（1585）を i.p.した。同時に、PAF-AH の阻害剤である Methyl Arachidonyl Fluorophosphonate（MAFP）を 1585 投与前にマウスに 1 あるいは 5mg/kg で i.p.し、同様の実験を行った。ショック反応誘導後、各タイムポイントでマウスを安楽死させ、血清中の PAF-AH 活性を解析し、IL-6 および TNF-α 産生量を ELISA 法で測定した。
【結果】細胞培養系では、1585 処理により、paf-ah2 mRNA 発現量および PAF-AH 活性の有意な増加が認められた。動物試験では、1585 の前投与により、LPS 誘導性ショックによる生存率と体温低下を有意に改善した。その作用効果は、MAFP の投与により阻害された。また、1585 は、血清中の PAF-AH 活性を誘導し、血清中の IL-6 と TNF-α 産生量を有意に抑制した。
【考察】PAF は、敗血症の発症過程において中心的な役割を果たすこと、また PAF-AH は、敗血症やエンドトキシンショックを改善することが報告されている。本研究の結果より、1585 の投与は、LPS 誘導性ショックを劇的に改善するとともに、炎症応答を抑制した。すなわち、1585 は PAF-AH を活性化することで、致死性のショック反応を強力に抑制することが明らかとなった。

A-type CpG-ODN, sepsis, platelet activating factor acetylhydrolase

発表責任者：下里　剛士（shimot@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2A01a07
講演日時：3 月 18 日 11:00～ A 校舎 01 会場

線虫を用いた抗肥満希少糖スクリーニング法の検討
Screening method for anti-obesity rare sugars using the nematode *C. elegans*
○山崎 誠志郎[1]、新谷 知也[2]、佐藤 正資[1] ([1]香川大農、[2]愛媛大院連合農学)
○Seishiro YAMASAKI[1], Tomoya SHINTANI[2], Masashi SATO[1] ([1]Kagawa Univ., [2]Ehime Univ.)

【目的】深刻化する肥満のまん延によって，世界の成人３分の１以上が健康上の悪影響を受けていると言われている。そのため，世界的に抗肥満（脂肪蓄積抑制）物質の探索が行われている。

希少糖とは「自然界に存在量が少ない単糖及びその誘導体」と定義される。希少糖は，その自然界での存在量の少なさと化学合成の困難さから，それらの生物活性はほとんど調べられていなかった。しかし，香川大学において希少糖を効率的，かつ網羅的に合成する酵素的手法が開発され，希少糖の生物活性が精力的に研究された。その結果，D-フルクトースの C3 エピマーである D-プシコースに内臓脂肪の蓄積を抑制する効果が報告された。演者らは，モデル生物である線虫 *Caenorhabditis elegans* を用いて，希少糖の生物活性の探索を行ってきた。本研究は，この *C. elegans* を用いて，数多く存在する希少糖から脂肪蓄積抑制物質をスクリーニングするための簡便な試験法の確立を目的とする。

【方法・結果】*C. elegans* は野生型 N2 とインスリン/IGF-1 受容体遺伝子欠損変異体（*daf-2*）を用いた。常法により成長の同調した第一期幼虫（L1）を調製した。餌として大腸菌を懸濁させた液体培地中で L1 を，N2 は 20℃，*daf-2* は 17℃において培養した。生殖細胞の細胞分裂を止めるため，第四期幼虫（L4）の時に FUDR を培地に添加して培養を続けた（N2，2 日目；*daf-2*，3 日目）。計 7 日間培養後，回収した線虫はビーズ破砕機により破砕・抽出した。抽出液の脂肪（トリグリセライド）濃度測定は市販の定量キット（トリグリセライド E-テストワコー）を用いた。

脂肪蓄積抑制活性の報告されている D-プシコースを用いて試験法の検討を行なった。試験物質を処理するタイミングを検討するために，線虫が L1 時（アッセイ開始時）と L4 時（上記）で D-プシコース処理（25，50mM）を行なった。N2 に対しては，D-プシコース処理によって線虫脂肪量は L1 処理区ではかえって増加し，L4 処理区ではわずかながら減少した。このことから，以後の D-プシコースは L4 時に行なうこととした。*daf-2* では，いずれの処理区でも脂肪減少が認められなかった。このことから D-プシコースの脂肪減少活性が，線虫ではインスリンシグナル系を介して発現している可能性が示された。

D-プシコース処理による脂肪の減少量がわずかであったため，培養法の改善が必要と考えた。脂肪量の変化をはっきりさせるため，脂肪量の多い線虫（肥満モデル線虫）を培養できる条件を探すことにした。具体的には，大腸菌濃度の検討，大腸菌を含む培地にさらに D-グルコース，D-フルクトース等の栄養成分の添加を行なったので，結果を報告する。

*Caenorhabditis elegans*, rare sugar, anti-obesity

発表責任者：佐藤正資（sato@ag.kagawa-u.ac.jp）

講演番号：2A01a08
講演日時：3 月 18 日 11:15～ A 校舎 01 会場

胆汁酸誘導性脂肪肝発症における血中アディポネクチンの関与
Involvement of plasma adiponectin in bile acid-induced fatty liver development
○加茂 佳恵[1]、花井 健人[1]、堀 将太[1]、多田 幸司[1]、田中 愛健[1]、古川 裕美子[2]、溝上 拓哉[2]、城内 文吾[2]、佐藤 匡央[2]、清水 英寿[3]、原 博[1]、石塚 敏[1] ([1]北大院・農、[2]九大院・農、[3]島根大・生資)
○Yoshie KAMO[1], Taketo HANAI[1], Shota HORI[1], Koji TADA[1], Yasutake TANAKA[1], Yumiko FURUKAWA[2], Takuya MIZOKAMI[2], Bungo SHIROUCHI[2], Masao SATO[2], Hidehisa SHIMIZU[3], Hiroshi HARA[1], Satoshi ISHIZUKA[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Kyushu Univ., [3]Shimane Univ.)

脂肪細胞から分泌されるアディポネクチンは炎症抑制やインスリン感受性亢進などの作用を示し、メタボリックシンドロームの症状に対して抑制的な効果があることが知られている。また、高脂肪食摂取による脂肪組織の肥大によって血中アディポネクチン濃度が低下する。高脂肪食を摂取すると脂質吸収に寄与する一次胆汁酸の分泌量が増大し、その組成は加齢によりコール酸に偏る。そこで我々は高脂肪食摂取時の胆汁酸環境を模倣するために、コール酸添加食をラットに給餌し、胆汁酸環境が血中アディポネクチンに及ぼす影響について調べた。雄性 WKAH/Hkm Slc ラットに、AIN-93G 準拠飼料と 0.05%コール酸添加食を与え 13 週間飼育した。解剖時に腹部大動脈および門脈を採血し、ELISA 法により血漿のアディポネクチン濃度を分析した。ラットの摂食量、体重および脂肪組織重量に変化はなかったが、血漿アディポネクチン濃度はコール酸群で有意に低下した。また、コール酸群では、肝臓でのトリグリセリドおよび総コレステロールの有意な蓄積増加を伴う脂肪肝が認められた。この時、酸化コレステロール分子種の一つである 4β-hydroxycholesterol (4β-OH) の肝臓濃度が有意に上昇していた。肝臓トリグリセリド濃度に対する各種パラメーターの影響度合いを解析するため重回帰分析を行った結果、 肝臓中 4β-OH 濃度が正の予測因子、血漿アディポネクチン濃度が負の予測因子であること、得られた自由度調整済み決定係数から肝臓トリグリセリド濃度の 70%以上を説明できることが示された。しかしながら、腎周囲脂肪および副睾丸脂肪におけるアディポネクチン遺伝子発現量の群間差は見られなかった。脂肪細胞へ分化させた 3T3-L1 細胞を用いてアディポネクチンの分泌に及ぼす胆汁酸の作用を検討したが、コール酸摂取ラットの門脈血中で増加するコール酸、タウロコール酸およびデオキシコール酸の刺激は、アディポネクチンの分泌に影響しなかった。アディポネクチン受容体である T-カドヘリンは GPI アンカー型タンパク質であり、傷害を受けた組織で T-カドヘリンが高発現することや、T-カドヘリンが高発現する組織でアディポネクチンが集積し保護的に作用することが報告されている。コール酸群の回腸粘膜では T-カドヘリンの遺伝子発現が増大し、回腸粘膜中のアディポネクチン濃度もコール酸群で増加したが、回腸粘膜におけるアディポネクチン遺伝子発現に群間差は見られなかった。これらのことから、コール酸負荷で血漿アディポネクチン濃度が低下する原因として、回腸部位における T-カドヘリン発現量増加を介したアディポネクチン蓄積が関与する可能性が示された。

Bile acid, Adiponectin, T-cadherin

講演番号：2A01a09
講演日時：3 月 18 日 11:30～ A 校舎 01 会場

# 胆汁酸摂取ラット回腸粘膜における IgA 産生の増加

# Increase of IgA production in ileal mucosa in rats fed cholic acid-supplemented diet

○竹内 あかり[1]、堀 将太[2]、趙 佳賢[2]、田中 愛健[2]、原 博[2]、石塚 敏[2] ([1]北大農、[2]北大院・農)
○Akari TAKEUCHI[1], Syota HORI[2], Gahyun JOE[2], Yasutake TANAKA[2], Hiroshi HARA[2], Satoshi ISHIZUKA[2] ([1]Hokkaido Fac. Agr., [2]Hokkaido Grad. Sch. Agr.)

[背景と目的]欧米食の普及とともにメタボリックシンドローム患者の増加が問題視されている。その原因の一部には高脂肪食の摂取があり、高脂肪食摂取により胆汁酸が増加することが報告されている。我々は、高脂肪食・加齢に伴い増加する一次胆汁酸であるコール酸(CA)をラットに摂取させると、消化管透過性の亢進、及び血中 adiponectin 濃度の低下などが生じることを見出した。CA 摂取ラットでは脂肪肝を生じるものの、炎症や繊維化といった重篤な脂肪肝で見られる症状は観察されず、単純性脂肪肝を呈することが見出された。これらのことから、この胆汁酸負荷条件では胆汁酸が免疫系の機能に影響を及ぼす可能性が示された。本研究では、獲得免疫系への影響を調べる一環として、粘膜免疫機構での主役を担う IgA 産生について検討した。
[方法](実験 1)WKAH/HkmSlc 雄性ラット(3 週齢)を予備飼育後、AIN-93G 準拠の飼料を与えた対照群または 0.05%CA 添加食を与えた群に分けて 13 週間飼育した。(実験 2) WKAH/HkmSlc 雄性ラットを予備飼育後、AIN-93G 準拠の飼料を与えた対照群または 0.05%CA 添加食を与えた群または 0.025%デオキシコール酸(DCA)添加食を与えた群に分けて 2 週間飼育した。それぞれ飼育期間終了後、麻酔下で門脈および腹部大動脈から採血を行い、各組織を採取した。ELISA 法によって、肝臓、糞、回腸粘膜、腹部大動脈における IgA を定量した。また、肝臓、糞、盲腸内容物、門脈血中の胆汁酸組成を UPLC-MS を用いて測定した。
[結果]実験 1 において、脂肪肝を発症する CA 群のラットの肝臓 IgA 濃度は対照群と比較して有意に低値であった。しかし、CA 群は脂肪肝で肝臓重量が増え、肝臓重量あたりの IgA 量で見ると有意差が見られないことから、IgA 濃度の減少は脂質蓄積による肝肥大によるものと考えられた。一方、消化管透過性の亢進が見られる回腸粘膜では、CA 群の IgA 濃度は対照群と比べ有意に高値となった。この時、CA 群では糞中 DCA 濃度が著しく増加しており、CA から 7α 脱水酸化を経て生成する DCA への変換が滞りなく進行することが示された。実験 2 でも、実験 1 と同様に CA 群で脂質蓄積に伴う肝臓重量の増加が確認された。この時、肝臓 IgA 量が CA 群では減少傾向、DCA 群では対照群と同等であった。これらのことから、CA そのものは IgA 産生そのものに影響を及ぼさないものの、CA から生成する DCA は肝臓や回腸粘膜にいて IgA 産生を上げる方向に作用すると考えることができる。特に、胆汁酸の腸肝循環に関与する部位でその影響が強く現れると推察された。

Immunoglobulin A, Bile acid

講演番号：2A01p01
講演日時：3 月 18 日 14:00～ A 校舎 01 会場

# 心筋結合型アディポネクチンは血圧ではなく、心肥大と相関する

# Heart-bound adiponectin correlates with cardiac hypertrophy, but not blood pressure.

○井上 敬夫[1]、竹森 久美子[2]、水口 信行[3]、木村 雅友[1]、筑後 孝章[1]、萩山 満[1]、米重 あづさ[1]、森 樹史[3]、前西 修[1]、米谷 俊[2]、伊藤 龍生[2]、佐藤 隆夫[4]、伊藤 彰彦[1] ([1]近大医、[2]近大農、[3]近大ライフサイエンス、[4]近大病院)
○ TAKAO INOUE[1], KUMIKO TAKEMORI[2], NOBUYUKI MIZUGUCHI[3], MASATOMO KIMURA[1], TAKAAKI CHIKUGO[1], MITURU HAGIYAMA[1], AZUSA YONESHIGE[1], TATSUFUMI MORI[3], OSAMU MAENISHI[1], TAKASHI KOMETANI[2], TATSUKI ITOH[2], TAKAO SATOU[4], AKIHIKO ITO[1] ([1]Kindai Univ. Med., [2]Kindai Univ. Agri., [3]Kindai Univ. Life Sci., [4]Kindai Univ. Hosp.)

【目的】抗メタボリックホルモンであるアディポネクチンの血中濃度と疾患発症との間には負の相関関係があるとの報告が多数なされている。一方、関連がないとの報告があり、未だ議論の余地がある。我々は、血中アディポネクチンとは別に臓器特異的に結合するアディポネクチンの存在を見いだしている。本研究では、血圧と心肥大に対する血中アディポネクチン濃度と心筋結合型アディポネクチン量の関係について検討した。

【方法】6, 12、20 週齢の正常血圧ラット(WKY)、血圧の異なる 2 種の高血圧ラット(SHR C&B2)、及び脳卒中ラット(SHRSP)の計 4 種を使用し、血圧、体重、心重量、血清アディポネクチン濃度の測定を行った。更に左心室に対して結合アディポネクチン量とその受容体である T-cadherin の発現量を調べるとともに、組織学的解析(左室壁厚、心筋断面積、線維化)を行った。

【結果】血中アディポネクチン濃度と血圧及び心肥大率(心重量/体重)では負の相関関係はみられなかった。一方、心筋結合アディポネクチン量は、SHRSP においてのみ有意な減少が確認された。アディポネクチンの受容体である T-cadherin においても同様の結果が得られたので、これは T-cadherin の発現減少によるものであると考えられた。WKY と SHR 間において結合アディポネクチン量に有意な差はみられず、心筋結合型アディポネクチンと血圧の間には関連性はなかった。組織学的解析によって得られた結果と心筋結合型アディポネクチン量の相関性を調べたところ、両者の間には負の相関関係がみられた。

【考察】アディポネクチンの疾患との関係性は、必ずしも血中濃度に依存しないことが明らかとなった。一方、心筋結合型アディポネクチン量は心肥大との関連性があり、その重要性が示された。

heart-bound adiponectin, serum adiponectin, cardiac hypertrophy

講演番号：2A01p02
講演日時：3 月 18 日 14:15～ A 校舎 01 会場

大気暴露時のマアジ *Trachurus japonicus* 骨格筋におけるタンパク質分解動態
Proteolytic dynamics in horse mackerel *Trachurus japonicus* skeletal muscle under severe stress
○小南 友里、林 達也、時弘 哲治、潮 秀樹（東大院）
○Yuri KOMINAMI, Tatsuya HAYASHI, Tetsuji TOKIHIRO, Hideki USHIO (Univ. of Tokyo)

【目的】
大気曝露を受けた魚類の骨格筋では，筋繊維の機械的な損傷や体温上昇などによって急激にタンパク質変性が進行し，身割れやヤケ肉などの品質低下をもたらすことが知られている．一方，オートファジーの誘導や結合組織の脆弱化など，大気曝露によるタンパク質分解の促進を示唆する報告もあることから，大気曝露による魚肉の品質低下にはタンパク質変性のみならずタンパク質分解も関連するものと考えられる．そこで，本研究では大気曝露時の魚類骨格筋におけるタンパク質分解のダイナミクスを明らかにすることを目的とし，ペプチドーム解析を行った．

【方法】
マアジ *Trachurus japonicus* を用い，延髄切断によって即殺した個体と 1，5，10 分間大気曝露した個体を得た．各個体の背側普通筋肉から，MWCO 5,000 の限外ろ過膜を用いて分子量が約 5,000 以下の遊離ペプチドを回収した．SDB チップを用いて粗抽出遊離ペプチドを脱塩し，nanoLC-ESI-MS/MS にて定量ペプチドーム解析を行った．また，各個体の背側普通筋肉から RNA を抽出し，次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析を行った．得られたペプチドームから被分解タンパク質を同定するとともに，各タンパク質の分解頻度を求めた．さらに，得られたペプチドームの末端配列傾向およびトランスクリプトーム解析で発現が認められたペプチダーゼの基質特異性を基に，線形重回帰モデルを用いて各ペプチダーゼの寄与度を算出し，大気曝露時間ごとに比較した．

【結果】
定量ペプチドーム解析の結果，大気曝露下のマアジ骨格筋では myosin heavy chain や troponin ，actin などの筋原線維タンパク質が高頻度で分解されていた．とくに，大気曝露 1 分後の個体では解糖系に関わる酵素が高頻度で分解されていた．また，線形重回帰モデルによる解析の結果では，大気曝露時間ごとに各ペプチダーゼの寄与度が異なることが明らかになった．以上の結果から，マアジ骨格筋では大気曝露時間によって分解標的となるタンパク質群およびペプチダーゼの競合状態が変化することが示され，激烈なストレス曝露に伴うタンパク質分解機構の作動バランスの変動が示唆された．

Peptidomics, Proteolytic dynamics, Multiple linear regression

発表責任者：潮秀樹（aushio@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A01p03
講演日時：3 月 18 日 14:30～ A 校舎 01 会場

マルチオミクス解析によるスジラア筋肉における代謝と概日リズム
Multi-omics analysis of muscular metabolism and circadian rhythm in leopard coral grouper
○馬久地 みゆき[1,2]、坂田 研二[2]、山口 智史[3]、小磯 雅彦[3]、菊地 淳[2,4,5] ([1]水産機構中央水研、[2]理研環境資源、[3]水産機構西海水研、[4]横市院生命医、[5]名大院生命農)
○MIYUKI MEKUCHI[1,2], KENJI SAKATA[2], TOMOHUMI YAMAGUCHI[3], MASAHIKO KOISO[3], JUN KIKUCHI[2,4,5] ([1]NRIFS FRA, [2]RIKEN CSRS, [3]SNFRI FRA, [4]Yokohama City Univ., [5]Nagoya Univ.)

【目的】スジアラ（沖縄地方名：アカジンミーバイ）は南方系のハタ科魚類であり、国内外で高級魚として需要が高い。需要増加に伴い天然資源を圧迫させないよう、また地域の産業振興のため、近年、スジアラの人工種苗を用いた養殖が着目されている。水産研究・教育機構ではスジラアの完全養殖を成功させたが、効率良く養殖をおこなうための技術改善の余地はある。とりわけ餌開発や給餌方法は重要な課題であるが、スジアラの代謝に関する基礎的知見は乏しい。そこで本研究ではスジアラの代謝産物動態と概日リズムについてマルチオミクス解析による解明を試みた。

【方法】水産研究・教育機構 西海区水産研究所亜熱帯研究センターで飼育されている 9 か月齢のスジアラを無給餌で 2 日間飼育した後、給餌で 2 日間飼育した。この間、午前 8 時より 4 時間おきに筋肉試料を採取した。cDNA ライブラリーを作製し次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析を行い、さらに NMR を用いたメタボローム解析を行った。データ解析は数値化した後、多変量解析、相関解析を用いてプロファイリングを行った。

【結果】次世代シーケンサーで得られたリードをアセンブルしたところ約 86,000 コンティグが得られた。その後 BLAST による相同性検索を行い 19,737 コンティグを参照配列として得られた全リードをマッピングした。発現量を算出し、遺伝子発現量変動パターンをプロファイリングした。階層的クラスタリング解析を行った結果、絶食 2 日目に発現量が変動する特徴的なクラスターが検出された。また主成分分析を行った結果、給餌と無給餌、朝と夜で区分されることが分かった。

代謝産物のプロファイリングを行うため、水抽出したサンプルを NMR を用いて 2D-Jres, HSQC, HSQC-TOQCY の 2 次元計測を行った。得られたシグナルを SpinAssign 等のウェブプログラムに供し、帰属を推定した。その後データの数値化を行い、判別分析を行ったところ給餌と無給餌、時系列を特徴付ける代謝産物が同定された。さらにトランスクリプトーム解析とメタボローム解析の結果を合わせて解析した結果、プリン代謝産物と代謝経路上の遺伝子発現パターンに相関があることが分かった。

multi-omics analysis, metabolism, circadian rhythm

講演番号：2A01p04
講演日時：3 月 18 日 14:45～ A 校舎 01 会場

# エストロゲン受容体βを介したダイゼインの骨格筋量と筋力への影響

# Effects of daidzein on skeletal muscle mass and muscle force via estrogen receptor ß

○河田 夏初、原田 直樹、山地 亮一（大阪府大院　生命環境）
○Natsuha KAWATA, Naoki HARADA, Ryoichi YAMAJI (Osaka Pref. Univ.)

【目的】ヒトの体重の約 40%を占める骨格筋は、運動器としての役割だけでなく、糖や脂質の代謝も担う。骨格筋の重量は筋タンパク質の合成と分解のバランスによって調節されており、骨格筋量の維持・増加に寄与する食品成分を日常の食事から摂取することは運動機能障害や代謝性疾患を予防・改善する上で重要である。骨格筋には女性ホルモンに特異的な受容体である 2 つのエストロゲン受容体アイソフォーム（ERαと ERβ）が発現しているが、骨格筋における ERβの詳細な機能は不明である。女性ホルモン様作用を有する大豆イソフラボンのダイゼインが骨格筋の細胞で ERαよりも ERβに対するアゴニスト活性が高いことを見いだした。そこで本研究ではダイゼインが骨格筋に及ぼす影響について検討した。
【方法と結果】8 週齢のオスとメスの C57BL/6J マウスに 0.1%ダイゼイン含有食を 1 週間摂食させたところ、メスマウスでのみ下肢の骨格筋であるヒラメ筋の重量が増加した。一方、下肢骨格筋の ERβをノックダウンしたメスマウスにダイゼイン含有食を 1 週間摂食させたところ、ヒラメ筋量が増加しなかったことから、ダイゼインが ERβを介してヒラメ筋量の増加に寄与することが判明した。次にメスマウスに 0.1%ダイゼイン含有食を 4 週間摂食させたところ、ダイゼイン摂食によりヒラメ筋の重量の増加とともにヒラメ筋の筋断面積がダイゼイン摂食群で有意に増加し、筋肥大が観察された。ヒラメ筋の等尺性収縮力を測定したところ、ダイゼイン摂食により強縮力は増加傾向（$p$=0.06）を示し、単位面積当たりの強縮力に変化は見られなかった。このことから、収縮機能の増加を伴う筋量の増加であることが示唆された。マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞を筋管細胞に分化させた後、ダイゼイン存在下で培養した。その結果、ダイゼインは筋管細胞の短径を増加、つまり筋管細胞を肥大させた。そこで筋肥大の要因となるタンパク質合成に及ぼすダイゼインの影響を SUnSET 法により検討したところ、ダイゼインにより puromycin でラベル化されたタンパク質が増加したことから、ダイゼインが筋タンパク質の合成を促進することが明らかとなった。また、ERβアゴニストである diarylpropionitrile（DPN）存在下で培養したところ、筋管細胞の肥大とタンパク質の合成が促進された。これらの作用は ERβをノックダウンすることにより抑制された。これらのことから、ダイゼインは筋管細胞に直接的に作用し、ERβを介して骨格筋のタンパク質の合成を促進することが判明した。現在、ダイゼインがタンパク質の分解に及ぼす影響について検討している。

Daidzein, Skeletal muscle, Estrogen receptor ß

講演番号：2A01p05
講演日時：3 月 18 日 15:00～ A 校舎 01 会場

好熱性新菌種 *Bacillus hisashii* N-11$^T$ 株の経口給与がマウスの大腿直筋の代謝機能に及ぼす影響
Effects of oral administration of *Bacillus hisashii* N-11$^T$ on the metabolic function of the mouse leg muscle

○岩田 菖子[1]、須田 亙[2,3]、福田 真嗣[4,5]、中西 裕美子[5]、加藤 完[5]、大野 博司[5]、服部 正平[2,6]、児玉 浩明[1]、宮本 浩邦[1,3,5,7]（[1]千葉大院・融合、[2]東京大院・新領域、[3]慶應大・医、[4]慶應大・先端生命、[5]理研・IMS、[6]早大・先進理工、[7]サーマス）
○Shoko IWATA[1], Wataru SUDA[2,3], Shinji FUKUDA[4,5], Yumiko NAKANISHI[5], Tamotsu KATO[5], Hiroshi OHNO[5], Masahira HATTORI[2,6], Hiroaki KODAMA[1], Hirokuni MIYAMOTO[1,3,5,7] ([1]Grad. Sch. Adv. Integr. Sci., Chiba Univ., [2]Grad. Sch. Fro. Sci., Tokyo Univ., [3]Fac. Med., Keio Univ., [4]Inst. Adv. Biosci., Keio Univ., [5]RIKEN IMS, [6]Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [7]Sermas ltd.)

**【背景】**

家畜生産性の向上に寄与する高温発酵産物中から機能性候補菌として見出された好熱性新菌種 *Bacillus hisashii* N-11$^T$ 株（国際寄託番号 NITE BP-863、以下 BP）は、マウスや豚に低濃度で経口給与した場合、成長を促進させる。一方、超高濃度の BP をマウスに飲水給与し CV（Conventional）条件下において高脂肪食により飼育した場合には、腸内細菌叢の変化や血液成分における抗肥満傾向、腹部脂肪量の減少、肝臓での解糖系の抑制傾向が見られる。BP を無菌マウスに飲水給与した場合には脂肪の蓄積や肝臓での代謝に変化は見られないことから、超高濃度 BP の経口給与は、腸内細菌叢を変化させることによりマウスの肥満を抑制することが示唆された。本研究では、SPF（Specific Pathogen Free）条件下において飼育したマウスを対象に、BP の経口給与が大腿直筋に及ぼす影響について評価することを目的にオミックス解析を行った。また併せて、生存状態の BP の他にγ線照射により死滅状態とした BP の懸濁液を作成しマウスに飲水給与して、菌体状態の違いが BP の効果に及ぼす影響も検証した。

**【方法】**

マウス（BALB/c）に対して馴化処理後、BP 非給与群、低濃度 BP 飲水給与群（$10^2$ CFU/mL）および超高濃度 BP 飲水給与群（$10^7$ CFU/mL）ならびにそれぞれのγ線滅菌済菌体給与群を設定し、SPF 条件下にて高脂肪食により 35 日間飼育した。次世代シークエンサー、GC-MS および CE-TOFMS を用いて、糞便および大腿直筋を対象として菌叢ならびに代謝産物の解析を行った。

**【結果】**

生存菌体を給与した群では、γ線滅菌済菌体を給与した群よりも腸内細菌叢においてわずかに Bacteroidetes の割合が高く、逆に Firmicutes の割合が低く推移する傾向にあった。また糞便においては、BP を給与すると糖やアミノ酸の含有量が減少する傾向が見られた。大腿直筋では、生存菌体を給与した群において、菌体の給与濃度に対して非依存的に分岐鎖アミノ酸のバリンやロイシン、イソロイシンなどが有意に増加するといった興味深い知見が得られた。

以上の結果より、BP の経口給与がマウスに及ぼす効果には飼育環境や菌体状態が影響するとともに、腸内細菌叢の変化に伴って筋肉の生理的機能にも影響を及ぼし得ることが示唆された。

Bacillus sp., mouse, omics analysis

発表責任者：宮本　浩邦（h-miyamoto@faculty.chiba-u.jp）

講演番号：2A01p06
講演日時：3 月 18 日 15:25～ A 校舎 01 会場

# 恒常的 BCAA 分解亢進は運動トレーニング効果にどのように影響するか

# The effect of constitutively enhanced BCAA catabolism on endurance training

○北浦 靖之、Xu Minjun、寺井 智勇、新土 大地、下村 吉治 (名大農)
○Yasuyuki KITAURA, Minjun XU, Chihaya TERAI, Daichi SHINDO, Yoshiharu SHIMOMURA (Nagoya Univ.)

【目的】

必須アミノ酸であるロイシン、イソロイシン、バリンは、その構造的および代謝的特徴より分岐鎖アミノ酸（branched-chain amino acids: BCAA）と総称され、骨格筋タンパク質に多く含まれている。また、BCAA は運動時にその分解が亢進し、エネルギー源として利用される。BCAA は 6 から 10 段階の反応で分解され、最終的にアセチル CoA またはスクシニル CoA となる。この分解機構の律速段階は第 2 段階の分岐鎖 α-ケト酸脱水素酵素（BCKDH: branched-chain α-keto acid dehydrogenase）による酸化的脱炭酸反応であり、BCKDH は、特異的キナーゼ(BDK: BCKDH kinase)により不活性化される。我々は BDK を筋特異的（muscle-specific）に欠損させたマウス（BDK-mKO マウス）を作製し、BCAA 分解を亢進させ、運動に対する影響を調べたところ、BCAA 分解亢進により血中、筋中 BCAA 濃度が低下し、運動トレーニングによる効果が減少することを見出した。本研究では、この現象のメカニズムの解明と BCAA 投与による BDK-mKO マウスの運動トレーニング後のパフォーマンスについて検討した。

【方法】

BDK-mKO マウスとコントロール（Con）マウスに 2 週間の走運動トレーニング（15 m/min x 60min x 5 回/週×1 週間→18m/min×60min x 5 回/週×1 週間）を負荷した。トレーニング後、それぞれの後肢筋を採取し、筋グリコーゲン量、各種代謝物量を測定した。また、３%BCAA を含む飲料水を与えるとともに 2 週間のトレーニングを負荷した後、走運動能力試験（15m/min の速度からスタートし、4 分ごとに 1 m/min ずつ速度を上昇）を行い、疲労困憊までの走行時間を測定し、走行距離を算出した。

【結果・考察】

Con マウスに比べ BDK-mKO マウスでは、筋中 BCAA 濃度に加え、筋グリコーゲン量、フルクトース-1,6-二リン酸などの解糖系中間体、クエン酸やイソクエン酸など TCA 回路の中間体、および Acetyl-CoA、NADH の量で低値を示した。このことから、BCAA 濃度の維持が、トレーニング後のエネルギー基質の維持に必要であることが示唆された。また、Con マウスに比べ BDK-mKO マウスでは、BCAA 飲料水摂取により、トレーニング後の走行距離が上昇した。したがって、トレーニング期間に BCAA を投与し、さらに BCAA 分解を亢進することは、運動パフォーマンスの上昇に有効である可能性が示唆された。

exercise, amino acid, energy metabolism

発表責任者：北浦靖之（ykitaura@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2A01p07
講演日時：3 月 18 日 15:40～ A 校舎 01 会場

# マグネシウム欠乏食摂取ラット大腿骨における遺伝子発現解析

# Femoral gene expression in rats fed magnesium deficient diets

○矢後 拓己[1]、石島 智子[1]、阿部 啓子[1,2]、岡田 晋治[1] ([1]東大院農生科・応生化、[2]神奈川科学技術アカデミー)
○Takumi YAGO[1], Tomoko ISHIJIMA[1], Keiko ABE[1,2], Shinji OKADA[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo, [2]KAST)

【背景・目的】生体内でマグネシウム（Mg）の約 60%は骨に存在し、その構成成分として、またミネラル代謝においても、重要な役割を果たしている。Mg 欠乏食をラットに投与した実験では、骨形成の抑制と骨吸収の促進により骨密度・骨強度が低下する。Mg は生体内で多くの生理的・生化学的作用に関与していることから、骨代謝においても未だ示されていない様々な影響が引き起こされると推察される。そこで本研究では、Mg 欠乏食を投与したラットの大腿骨について DNA マイクロアレイ解析を行い、Mg の摂取不足が骨代謝に及ぼす影響を遺伝子レベルで包括的に理解することを目的とした。
【方法】被験動物に 3 週齢 Wistar 系雄性ラットを用いた。飼料は AIN-93G 飼料組成を基に作製し、Mg 欠乏食（MD）は Mg 給源の酸化 Mg を除いて作製した（Mg 濃度：0.004%）。18 匹のラットを正常食（C, Mg 濃度：0.05%）で 7 日間の予備飼育後に 3 群に分け（n=6）、C または MD を自由摂食させる群（C 群、MD 群）、MD 群が摂取した量と同量の C を投与するペアフィーディング（PF）群を設定し、それぞれ 28 日間飼育し、解剖した。解剖直前の 24 時間尿を採取し、解剖時には血液の採取と大腿骨の摘出を行った。血清中ミネラル濃度、血清中および尿中の骨代謝マーカーを測定した。摘出した大腿骨については骨密度・骨強度の測定、そして DNA マイクロアレイ解析を行った。
【結果】血清ミネラル濃度より PF 群に対して MD 群では、Mg 欠乏状態が引き起こされていることを確認した。骨代謝マーカーの変動から、骨形成の抑制と骨吸収の促進が示唆された。大腿骨の骨密度および骨強度は低下していた。また、大腿骨の長さは短くなっていた。次いで、MD 群と PF 群の大腿骨について DNA マイクロアレイ解析を行った。階層的クラスター解析の結果、MD 群と PF 群でクラスターが分かれ、Mg 欠乏は大腿骨の遺伝子発現に大きく影響を与えることが示された。Mg 欠乏による遺伝子の発現変動から、免疫系の活性化による破骨細胞の分化および骨吸収促進、細胞運動の抑制による骨芽細胞の骨形成抑制が示唆された。また、グリコサミノグリカン分解促進により大腿骨が短くなることや弾力性の低下が引き起こされることが示唆された。
【謝辞】本研究は、SIP（戦略的イノベーション創造プログラム 研究課題番号 14533567）「次世代農林水産業創造技術」（農研機構生研センター委託研究）によって実施されました。

magnesium, bone metabolism, DNA microarray

講演番号：2A01p08
講演日時：3 月 18 日 15:55～ A 校舎 01 会場

リン供給源の形態の違いが、高リン食摂取ラットの骨代謝に及ぼす影響の包括的検討
Comprehensive study of the effect of different dietary phosphate forms on the bone metabolism in rats fed high-phosphorus diet

○鳴神 未稀[1]、矢後 拓己[1]、石島 智子[1]、阿部 啓子[1,2]、岡田 晋治[1] ([1]東大院農生科・応生化、[2]神奈川科学技術アカデミー)
○Miki NARUKAMI[1], Takumi YAGO[1], Tomoko ISHIJIMA[1], Keiko ABE[1,2], Shinji OKADA[1] ([1]1Dept. Appl.Biol. Chem., The Univ. Tokyo, [2]KAST)

【背景・目的】リンの過剰摂取は骨代謝に影響を及ぼすとされ、動物モデルの解析では高代謝回転型の骨密度と骨強度の低下を誘導することが報告されている。一方、正リン酸塩と重合リン酸塩という異なる形態でリンを供給した場合、両者によるリン過剰摂取の影響には違いがないことが、骨代謝マーカーや DEXA 法による大腿骨骨密度の測定結果から報告されている。しかし、遺伝子レベルでの影響の違いは不明なため、本研究では、リン供給源に正リン酸塩および重合リン酸のカリウム塩を用い、高リン食を摂取したラットの大腿骨において DNA マイクロアレイ解析を行い、遺伝子発現の変動から 2 つのリン供給源による骨代謝への影響を包括的に理解することを試みた。
【方法】リン供給源には、正リン酸塩としてリン酸二水素カリウム、重合リン酸塩としてポリリン酸カリウムを用いた。飼料は AIN-93G 飼料組成を基に作製し、飼料中のリン濃度は正常食(C)が 0.3%、高リン食(HP)は 1.1%とした。被験動物には 4 週齢 Wistar 系雄ラットを用い、C で 1 週間予備飼育後、3 群に分け、C 群、HP 群(共に自由摂食)、HP 群とペアフィーディングを行う PF 群とし、3 週間飼育を行った。解剖時に血液の採取と大腿骨の摘出を行った。血清中ミネラル濃度の測定、大腿骨については骨密度の測定、DNA マイクロアレイ解析を行った。
【結果】血清中リン濃度について、正リン酸塩では HP 群で有意に増加したが、重合リン酸塩では有意な変化は見られなかった。大腿骨の骨密度について、正リン酸塩の場合、骨全体では HP 投与による有意な変化は見られなかったが、皮質骨では HP 群が PF 群に比べ有意に低下し、また海綿骨では中間部で有意に増加していた。一方重合リン酸塩の場合、いずれも HP 投与による有意な変化は見られなかった。また、HP 群と PF 群の大腿骨の DNA マイクロアレイ解析では、クラスター解析の結果、正リン酸塩に比べ、重合リン酸塩は HP 投与による影響は小さいことが示唆された。2 群間比較により同定した HP 投与による発現変動遺伝子には、正リン酸塩では、骨化、ストレス応答、筋システム、骨や軟骨の発達などに関する遺伝子が多く含まれていた。重合リン酸塩では、骨化、ストレス応答、筋システム、免疫応答、細胞接着などに関する遺伝子が多く含まれていた。詳細は現在解析中である。
【謝辞】本研究は、総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム 研究課題番号 14533567)「次世代農林水産業創造技術」（農研機構生研センター委託研究）によって実施されました。

bone metabolism, high-phosphorus diet, DNA microarray

講演番号：2A01p09
講演日時：3 月 18 日 16:10～ A 校舎 01 会場

カイコウオオソコエビ外骨格の分析
Analysis of Hirondellea gigas's exoskeleton
○小林 英城[1]、下重 裕一[2]、中島 義賢[2]、荒井 渉[1]、高見 英人[1]([1]海洋機構、[2]東洋大バイオナノ)
○Hideki KOBAYASHI[1], Hirokazu SHIMOSHIGE[2], Yoshikata NAKAJIMA[2], Wataru ARAI[1], Hideto TAKAMI[1] ([1]JAMSTEC, [2]Toyo Univ.)

【緒言】深度 8,000 m を超える超深海は、超高水圧、低温、暗黒、そして貧栄養な環境であり、生物にとって生命活動を営むことが困難な極限環境である。しかしながら、世界最深部マリアナ海溝チャレンジャー海淵（深度約 10,500 m）を始め、日本海溝や伊豆小笠原海溝の深度 9,000 m を超える超深海海底には、端脚類のヨコエビ（和名：カイコウオオソコエビ）が生息している。これら超深海性ヨコエビは、無人探査船「かいこう」による探索の結果、活発に運動している様子が観察・映像記録されている。なぜ、これら超深海性ヨコエビがこの過酷な極限環境に適応できるのか、不明であった。我々はこれまで、カイコウオオソコエビがセルラーゼを始めとして、多種の植物性多糖分解酵素を消化酵素として保持し、海底の沈降植物片より栄養を得て、貧栄養環境に適応することを示した(1)。しかし、超高水圧に対する適応機構は不明なままである。超高水圧の影響は、まずその外骨格に現れると考えられる。なぜなら、甲殻類がその形態を維持するために重要な炭酸カルシウムが、高水圧により溶解するからである（式１）。この炭酸カルシウムの溶解は深度約 4-5,000 m から発生し、この深度は、炭酸塩補償深度と呼ばれている。また、深度が深くなればなるほど、溶解速度が上昇する。

$CaCO_3+CO_2+H_2O \rightarrow Ca^{2+}+2HCO^-$・・・（式１）

そこで我々はカイコウオオソコエビ外骨格の構成成分を分析し、超高水圧の影響を調べることで、超深海適応機構の一端を得られると期待した。

【実験方法と結果】チャレンジャー海淵から採取されたカイコウオオソコエビを用いて、外骨格を剥離・乾燥後、走査型電子顕微鏡観察下にてエネルギー分散型 X 線分析（SEM/EDS）を行なった。その結果、非常に多くのカルシウムが検出された。また、外骨格の粉体 X 線回折分析（XRD）を行なったところ、炭酸カルシウム結晶のピークが得られた。炭酸カルシウムの結晶は三方晶系のカルサイトだった。一方、チャレンジャー海淵には有孔虫が生息し、全て炭酸カルシウムではなく有機物の殻を持つ種属であることが報告されている(2)。したがって、カイコウオオソコエビは炭酸塩補償深度以深においても、結晶性炭酸カルシウムを維持できる機構を持っていることがわかった。この維持機構が、カイコウオオソコエビの超深海環境への適応機構の一端であることが推察された。

【引用文献】
(1) Kobayashi, H., et al. (2012) *PloS one* 7.8:e42727.
(2) Todo, Y., et al. (2005) *Science* 307: 689-689.

deep-sea organisum, exoskeleton, calcium carbonate

発表責任者：小林英城（hidekik@jamstec.go.jp）

講演番号：2A01p10
講演日時：3 月 18 日 16:25～ A 校舎 01 会場

# アルキルピラジン化合物の恐怖行動誘起作用の構造活性相関について

# Structure-activity relationships of Alkylpyrazine analogues and fear-associated behaviors in mice

○長田 和実[1]、宮園 貞治[2]、柏柳 誠[2]([1]北医療大歯、[2]旭川医大医)
○Kazumi Osada[1], Sadaharu Miyazono[2], Makoto Kashiwayanagi[2] ([1]Health Sci Univ Hokkaido, [2]Asahikawa Med Univ)

我々はオオカミ尿中に一群のアルキルピラジン化合物が含まれており、これらがマウスやエゾシカに恐怖反応を引き起こす新たな kairomones であることを報告してきた。本研究ではアルキルピラジン類似物の構造活性相関を明らかにするために、C57BL/6j マウスにおける 4 種類の恐怖関連行動（すくみ行動時間の延長、移動運動量の低下、におい探索行動の低下、および忌避反応の増加）を測定した。17 種類のアルキルピラジン化合物のうち、2, 3-ジエチルピラジン、3-エチル-2,5-ジメチルピラジン、5-エチル-2,3-ジメチルピラジンなどの化合物が 4 種類すべての恐怖関連行動を誘起し、2,3,5-トリメチルピラジンはそれらに次ぐ強い恐怖誘起作用を示した。これらの結果をクラスター解析すると、上記 4 種類の化合物が同一のクラスターを形成し、対照群を含む他のアルキルピラジンとは異なった 2 大グループを形成した(LD25.0)。そのうち 2,3,5-トリメチルピラジンは他の 3 種類の隣に単独のクラスターを形成した（LD5.0)。一方、アルキルピラジン化合物の蒸気圧や融点などは活性との直接の関係はなかった。また、2,3-ジエチルピラジンの 3 位のエチル基を他の官能基に置換しても恐怖反応のさらなる上昇は見られなかった。以上の結果をまとめると、2, 3-ジエチルピラジン、3-エチル-2,5-ジメチルピラジン、5-エチル-2,3-ジメチルピラジンの構造的な特徴よりピラジン環の側鎖が 4 個の炭素原子からなり、エチル基かメチル基のみで構成された化合物が最も高い恐怖誘起活性があることが示唆された。

pyrazine analogue, wolf, kairomones

発表責任者：長田和実（osadak@hoku-iryo-u.ac.jp）

講演番号：2A01p11
講演日時：3 月 18 日 16:50～ A 校舎 01 会場

# 自閉症様行動をレスベラトロールは改善する

# Resveratrol ameliorates autism like behaviour

○菊池 昇平[1]、日出間 志寿[1]、堀江 謙吾[1]、矢内 隆章[2]、高田 良二[2]（[1]東北大農、[2]キリン(株) R&D）
○Shouhei Kikuchi[1], Shizu Hidema[1], Kengo Horie[1], Takaaki Yanai[2], Ryouji Takada[2]（[1]Tohoku Univ., [2]KIRIN Co., Ltd. R&D）

レスベラトロール(trans-resveratrol ： RES)は、ぶどうの皮や赤ワイン、ピーナッツの赤皮に多く含まれるポリフェノールの一種であり、生理活性物質として注目を集めている。RES は抗酸化作用、抗がん作用、抗肥満作用、抗がん作用、うつ病様行動改善など様々な作用が示されている。先行研究において以下の報告がされている。妊娠マウスに対するバルプロ酸(VPA)投与によって後代マウスは自閉症スペクトラム症(ASD)様行動を呈することが知られている。ASD とは社会性の障害、コミュニケーションの障害、興味の限局、反復性といった特徴をもつ発達障害群である。この VPA 投与によって誘発される ASD 様行動を呈する(VPA 投与 ASD 様)ラットについて、妊娠マウスに対して RES と VPA を投与することで後代マウスの ASD 様行動が予防されるという報告がされた。しかし、ASD 様行動を呈する成獣マウスへの RES 投与による改善効果については不明であった。
よって、我々は成獣齢における VPA 投与 ASD 様モデルマウスへの RES 投与が ASD 様行動を改善するのかについて検証した。また、複数の ASD 様モデルマウスに対しても RES が ASD 様行動を改善するのかについても検証することにし、Oxytocin receptor(Oxtr)ノックアウトマウスを用いて検証した。
Oxytocin(Oxt)と Oxtr からなる脳内制御機構は、その障害と ASD に関連が言われている。Oxt は 9 アミノ酸からなるペプチドホルモンであり神経調節物質である。先行研究において、脳内の Oxt/Oxtr システムは、コミュニケーション、子育て、恐怖反応といった社会行動を制御するのに重要な役割をもつと考えられている。
成獣齢オスの VPA 投与 ASD 様モデルマウスにたいして、RES を 30 mg/kg で腹腔内単回投与し、24 時間後に社会性を評価する Three chamber test を行った。また、Oxtr ノックアウトマウスに対しても同様の条件で実験を行った。
結果、VPA 投与 ASD 様モデルマウスおよび Oxtr ノックアウトマウスの 2 つの ASD 様モデルで ASD 様行動が改善することが示された。
複数の ASD 様モデルに対して RES が改善効果を持つということは幅広い ASD 患者に対して有効な治療薬となる可能性がある他、複数の ASD 様モデルについて共通の ASD 様行動改善メカニズムがあることが考えられ、そのメカニズム解明を目指している。

Resveratrol, autism, social

講演番号：2A01p12
講演日時：3 月 18 日 17:05～ A 校舎 01 会場

Oxytocin 受容体発現ニューロンによる母性行動制御
Regulation of Maternal Behavior by Oxytocin Receptor-expressing neurons
○日出間 志寿[1]、宮崎 慎至[1]、大塚 彩乃[1]、堀江 謙吾[1]、矢田 沙織[1]、菊池 昇平[1]、木野崎 萌[1]、水上 浩明[2]、西森 克彦[1] ([1]東北大農、[2]自治医科大学)
○Shizu HIDEMA[1], Shinji MIYAZAKI[1], Ayano OTSUKA[1], Kengo HORIE[1], Saori YADA[1], Shohei KIKUCHI[1], Mebae KINOSAKI[1], Hiroaki MIZUKAMI[2], Katsuhiko NISHIMORI[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Jichi Univ.)

【目的】母性行動は、子からの刺激を受容することで引き起こされる進化的に広く保存された、営巣や保育などの子の生存率を高めるための行動の総称であり典型的な向社会行動の一つである。母性行動には性ホルモンなど様々な遺伝子が関与していることが知られているが、当研究室によって、下垂体後葉ホルモンであるオキシトシン（OXT）及びその受容体であるオキシトシン受容体（OXTR）がマウスの母性行動に重要であることが示された。マウス以外の齧歯類や哺乳類、ひいてはヒトでも母性行動に OXT/OXTR システムが関与するという報告もなされている一方で OXT/OXTR システムの母性行動制御機構の詳細は解明されていない。そこで本研究では、母性行動においてどの脳領域の OXTR が特に重要な働きをしているのかを解明することを目的とした。

【方法・結果】本研究室で作出した OXTR のプロモーターで Venus が発現するマウスの非発情期・出産中・母性行動中の脳を取りだし、その薄切片を神経の活性化マーカーである c-fos と Venus との二重免疫染色に供した。母性行動の中心的な役割を果たす脳領域である内側視索前野（MPOA）では Venus 及び c-fos の共局在が見られた神経、すなわち神経活性化が起こっている OXTR 発現細胞の数が出産中・母性行動中でそれぞれ有意に増加していた。主にストレス制御にかかわるとされる外側中隔(LS)では母性行動中に、OXT の産生領域である視索上核(SON)では出産中に神経活性化が起こっている OXTR 発現細胞が優位に増加していた。このことから母性行動の惹起や母性行動そのものに MPOA と LS の OXTR ニューロンが重要である可能性が考えられた。そこで本研究室で作出された OXTR のプロモーターで OXTR と Cre が発現するマウス(OXTR-Cre)の MPOA に、Cre 発現細胞で細胞死を誘導するアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターをインジェクションし、MPOA あるいは LS 特異的に OXTR ニューロンを破壊したマウスについて、母性行動への影響を観察した。その結果、MPOA 特異的に OXTR ニューロンを破壊した場合母性行動に影響はみられず、LS 特異的に OXTR ニューロンを破壊すると仔マウスを巣内に回収する時間の遅滞や抱きかかえている時間が短いなど母性行動の低下がみられた。次に OXTR 遺伝子欠損マウスの LS 領域に AAV-OXTR ベクターを感染させ LS 特異的に OXTR を発現させると OXTR 遺伝子欠損マウスの母性行動の回復がみられた。以上のことから LS 領域は母性行動の制御にかかわっていることが示唆された。現在、LS の OXTR ニューロン種、OXTR ニューロンが中継する神経回路の解析を進めている。

oxytocin, Maternal Behavior, Neuron

発表責任者：日出間　志寿（hidema@biochem.tohoku.ac.jp）

講演番号：2A01p13
講演日時：3 月 18 日 17:20～ A 校舎 01 会場

線虫 *C. elegans* の幼虫休眠を制御する短鎖 C 末端アミドペプチド FLP-21 の機能解析
Functional analysis of a *C. elegans* peptide amide, FLP-21, regulating larval diapause
○国松 友香、松下 健次朗、岩崎 崇、河野 強（鳥取大農）
○Yuka Kunimatsu, Kenjirou Matsushita, Takashi Iwasaki, Tsuyoshi Kawano (Tottori Univ.)

【背景】モデル生物・線虫 *C. elegans* は生育環境の悪化（個体密度の上昇、エサの枯渇、高温）に応答して生育を停止し、幼虫休眠に入る。環境因子は頭部感覚神経で受容され、下流の TGF-β様シグナルならびにインスリン様シグナルを制御し、通常生育/休眠を決定づけることが明らかとなっている。しかしながら、環境因子がどのように上記ペプチドホルモンシグナルを制御するのかは不明のままである。我々は休眠制御に重要な役割を果たす頭部化学受容細胞の 1 つ ASJ 細胞に着目し [1)]、「ASJ 細胞で発現する短鎖 C 末端アミドペプチドが初期発動して上記ペプチドホルモンシグナルを制御する」との作業仮説の下、ASJ 細胞等で発現する FMRF アミド関連ペプチド FLP-21 に着目した。FLP-21 は FLP-18 と共に単独/集団摂食行動を制御するペプチドであり、受容体 NPR-1(GPCR)を介することが知られているが [2)]、FLP-21 の休眠への関与は全く知られていない。

【方法と結果】休眠誘導フェロモン存在下で *flp-21* 遺伝子破壊線虫の休眠率を測定したところ、著しい休眠率低下が認められた。一方、*npr-1* 遺伝子破壊線虫は休眠率低下を示さなかった。さらに、*npr-1* のパラログである *npr-5* の遺伝子破壊線虫も殆ど休眠率低下を示さなかった。以上のことから、FLP-21 は他の GPCR を介して休眠を制御することが示唆された。次いで、FLP-21 が TGF-β様シグナルならびにインスリン様シグナルを制御する可能性を検証するために、エピスタシス解析を行った。その結果、FLP-21 は両ペプチドホルモンシグナルを制御する可能性が示唆された。そこで、休眠を制御する TGF-β様ペプチド DAF-7 とインスリン様ペプチド DAF-28 ならびに INS-35 の合成・分泌に対する FLP-21 の影響を検証することとした。DAF-7::mCherry, DAF-28::mCherry, INS-35::mRFP 発現線虫と *flp-21* 遺伝子破壊線虫を交雑した。現在、共焦点レーザースキャン型顕微鏡を用いて個々のペプチドホルモンの産生量（産生細胞を観察）と分泌量（偽体腔のスカベンジャー細胞への蓄積）の変動を観察している。

参考文献
1. Bargmann CI (1991) Science 251:1243
2. Rogers C (2003) Nat. Neurosci. 6:1178

*C. elegans*, nueropeptide, diapause

発表責任者：河野　強（kawano@muses.tottori-u.ac.jp）

講演番号：2A01p14
講演日時：3 月 18 日 17:35～ A 校舎 01 会場

線虫 *C. elegans* の休眠を制御する短鎖ペプチド NLP-24 とその受容体 NPR-17 の機能解析
Functional analyses of a *C. elegans* short peptide, NLP-24, and its receptor, NPR-17, regulating diapause

○原田 敦美、岩崎 崇、河野 強（鳥取大院農）
○Atsumi HARADA, Takashi IWASAKI, Tsuyoshi KAWANO (Tottori Univ.)

【背景】モデル生物・線虫 *C. elegans* は生育環境の悪化（個体密度の上昇、エサの枯渇、高温）に応答して生育を停止し、幼虫休眠に入る。環境因子は頭部感覚神経で受容され、下流の TGF-β様シグナルならびにインスリン様シグナルを制御し、通常生育/休眠を決定づけることが明らかとなっている。しかしながら、環境因子がどのように上記ペプチドホルモンシグナルを制御するのかは不明のままである。我々は休眠制御に重要な役割を果たす頭部化学受容細胞の 1 つ ASI 細胞に着目し [1)]、「ASI 細胞で発現する短鎖ペプチドが初期発動して上記ペプチドホルモンシグナルを制御する」との作業仮説の下、頭部神経細胞では ASI 細胞のみに発現するオピオイドペプチド NLP-24 に着目した。NLP-24 はエサに対する嫌悪行動を制御するペプチドであり、受容体 NPR-17(GPCR)を介することが知られているが [2)]、休眠への関与は全く知られていない。また NPR-17 は ASI 細胞ならびに腸で発現することが知られている。
【方法と結果】休眠誘導フェロモン存在下で *nlp-24* 遺伝子破壊線虫の休眠率を測定したところ、著しい休眠率低下が認められた。また、*npr-17* 遺伝子破壊線虫も著しい休眠率低下を示したことから、NLP-24/NPR-17 が嫌悪行動に加えて休眠を制御することが示唆された。次いで、NPR-17 が TGF-β様シグナルならびにインスリン様シグナルを制御する可能性を検証するために、エピスタシス解析を行った。その結果、NPR-17 は両ペプチドホルモンシグナルを制御する可能性が示唆された。そこで、休眠を制御する TGF-β様ペプチド DAF-7（主に ASI 細胞で産生）とインスリン様ペプチド DAF-28（主に ASI 細胞で産生）ならびに INS-35（主に腸で産生）[3)]の合成・分泌に対する NLP-24/NPR-17 の影響を検証することとした。DAF-7::mCherry, DAF-28::mCherry, INS-35::mRFP 発現線虫の *npr-17* 破壊株を作出した。現在、共焦点レーザースキャン型顕微鏡を用いて個々のペプチドホルモンの産生量（産生細胞を観察）と分泌量（偽体腔のスカベンジャー細胞への蓄積）の変動を観察している。

1. Bargmann CI (1991) Science 251:1243
2. Cheong MC (2015) eLife 4:e06683
3. Matsunaga Y (2016) Nat. Commun. 7:10573

*C. elegans*, diapause, regulation

発表責任者：河野強（kawano@muses.tottori-u.ac.jp）

講演番号：2A01p15
講演日時：3 月 18 日 17:50～ A 校舎 01 会場

# 妊娠後期における糖質摂取状態がマウスの行動及びストレス応答に及ぼす影響

# Effect of carbohydrate restriction during late gestation on the behavior and stress response in mice

○小森 誠、平井 静、越野 由希絵、西野 光里、石井 彩香、戸田 絢子、江頭 祐嘉合（千葉院・園芸・応生化）
○Makoto KOMORI, Shizuka HIRAI, Yukie KOSHINO, Hikari NISHINO, Ayaka ISHII, AYAKO TODA, Yukari EGASHIRA (Chiba Univ.)

【背景・目的】

近年の実験動物を用いた先行研究や疫学調査により、子宮内で低栄養状態であった子は低体重で出生し、生活習慣病や精神疾患発症リスクが高いことが示唆されている。しかし、これまでに報告されている胎生期低栄養に関する研究においては、総摂取エネルギーまたはタンパク質の低下に着目したものが主であった。これまでに我々は、妊娠後期における糖質制限は、総エネルギー制限とは異なり、マウス出生仔において高脂肪食誘導性の糖・脂質代謝異常の増悪化を引き起こさないことを見出している。しかしながら、妊娠期の糖質制限が出生仔における行動に及ぼす影響はいまだ不明であるため、糖質制限モデルマウスを用いて検討を行った。

【対象・方法】

妊娠 10 日目の C57BL/6J 雌マウスを、対照食摂取群（Control：C 群）、摂取量の制限によりすべての栄養成分を均等に制限した 40%kcal 総エネルギー制限群（Restriction：R 群）、糖質のみの制限により摂取エネルギーの 40%を制限した 40%kcal 糖質制限群（Carbohydrate Restriction：CHR 群）に分けてそれぞれの飼料を摂取させ、出産させた。出産後はいずれの群の母マウスにも対照食を摂取させた。仔マウスは生後 10 週齢にてオープンフィールド試験、高架式十字迷路試験、強制水泳試験を実施した。また、拘束ストレス負荷時の血中コルチコステロン濃度の変動を測定した。

【結果・考察】

R 群の雄はオープンフィールド試験において、中央区画滞在時間の低下傾向を示し、高架式十字迷路試験においては、覗き込み行動の減少傾向を示し、不安様行動の増加が示唆されたが、CHR 群ではこのような変化は認められなかった。また、強制水泳試験において、R 群の雄は無動時間の低下傾向を示したが、CHR 群では確認されなかった。これらのことから、妊娠期における糖質制限は、総エネルギー制限とは異なりマウスの行動異常を誘導しないことが示唆された。また、拘束ストレス負荷に伴う血中コルチコステロン濃度の上昇反応は、CHR 群の雄では低下、R 群の雌では上昇傾向を示したことから、糖質制限マウスにおけるストレス応答性の低下が示唆された。

Carbohydrate restriction, late gestation, stress response

発表責任者：平井　静（shizuka@faculty.chiba-u.jp）

講演番号：2A01p16
講演日時：3 月 18 日 18:05～ A 校舎 01 会場

# 自律神経活動を指標とした合わせ出汁の抗疲労効果

# Effects of dashi on autonomic nerve and mental fatigue

○森滝 望[1]、山崎 英恵[2]、井上 和生[1] ([1]京大農、[2]龍大農)
○Nozomi MORITAKI[1], Hanae YAMAZAKI[2], Kazuo INOUE[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Ryukoku Univ.)

【目的】2013 年に和食がユネスコ無形文化遺産に登録されるなど、日本食に対する関心が高まってきている。その理由の１つとして、日本人の長寿や肥満防止を支える優れた栄養バランスが挙げられる。しかしながら、こうした身体的な健康価値が注目されている一方で、日本食が精神にもたらす効能については研究が進んでいない。そこで本研究では、日本食の基盤となる味わいを形成する合わせ出汁に注目し、その摂取による自律神経活動変化の測定および抗疲労効果の検討を行った。

【方法】サンプルとして鰹と昆布の合わせ出汁およびお湯を用いた。20-25 歳の健康な男女（n=24）を対象とした。被験者は朝 9:00 に指定の朝食を摂取し、その後 10:30 より実験を開始した。自律神経活動は心拍変動パワースペクトル解析法により評価した。入室後に 10 分間の安静時間をとり、サンプル摂取による自律神経活動変化を測定した。1 回目の測定後、サンプルの摂取および 4 回の測定を行った。サンプルを摂取する際、嗜好性を Visual Analogue Scale（VAS）にて評価した。また、合わせ出汁の効果についてその作用機序を調べるため、出汁の香気を吸引することによる自律神経活動変化を同様のプロトコルにて検討した。さらに、サンプルの抗疲労効果について検討するため、フリッカー試験を実施した。これは点滅光と連続光を判別する周波数を指標とし、被験者の精神疲労を評価する手法である。また、一定の精神疲労を負荷するため単純な計算タスクを課した。被験者は 1 回目の測定後、サンプルを摂取した。摂取後、30 分間の計算タスクを課し、2 回目の測定を行った。また測定の際、主観的な疲労度を VAS にて評価した。

【結果と考察】合わせ出汁の摂取および香気吸引はいずれも副交感神経活動を亢進した。また、フリッカー試験において、合わせ出汁を摂取することで計算タスクによる精神疲労が軽減された。VAS においても主観的な疲労度が軽減される傾向が見られた。合わせ出汁には短期的なリラックス効果、抗疲労効果があり、その一因として香気が重要な役割を担っていることが推察された。

dashi, autonomic nerve, anti-fatigue

発表責任者：森滝　望（nontyan199312@gmail.com）

講演番号：2A02a01
講演日時：3 月 18 日 09:20～ A 校舎 02 会場

コレステロール認識配列 CRAC は、ヒト ABCG4 のコレステロール輸送において重要である
Cholesterol recognition amino acid consensus sequence (CRAC) is important for cholesterol transport of human ABCG4.

○見月 俊吾[1]、木村 泰久[1]、木岡 紀幸[1]、松尾 道憲[2]、植田 和光[1,3] ([1]京大院・農・応用生命、[2]京女・家政・食物栄養、[3]京大・物質-細胞統合システム拠点)
○Shungo Mitsuki[1], Yasuhisa Kimura[1], Noriyuki Kioka[1], Michinori Matsuo[2], Kazumitsu Ueda[1,3] ([1]Division of Applied Life Sciences, Graduated school of Agric, Kyoto Univ., [2]Department of Food and Nutrition, Kyoto Woman's Univ., [3]iCeMS, Kyoto Univ.)

＜背景・目的＞ABCG4 は ABC タンパク質ファミリーに属する膜タンパク質で、ATP 加水分解エネルギーを用いてコレステロールを輸送する。ABCG4 は 1 分子内に膜貫通ドメインと ATP 結合・加水分解ドメインを一つずつ持ち、ダイマーを形成して機能する。ABCG4 は巨核球前駆細胞で血小板の産生を制御することや、脳のアストロサイトや中枢神経系の神経細胞に多く発現して、アルツハイマー病などの神経変性疾患と関連することが報告されている。しかし、生理機能は明らかになっていない部分が多く、コレステロールの認識機構も不明である。近年、コレステロール認識配列として CRAC 配列 ($L/V-X_{1-5}-Y-X_{1-5}-K/R$) が同定された。配列解析の結果、ABCG4 の第 6 膜貫通ヘリックス(TM6)にも CRAC 配列が存在することが明らかとなった。本研究では、ABCG4 の TM6 に存在する CRAC 配列に着目して解析を行い、コレステロール認識に CRAC 配列が関与しているかどうかを明らかにすることを目的とした。
＜方法・結果＞CRAC 配列の中ではチロシンとアルギニンがコレステロール認識に重要であるため、チロシンをアラニンに、アルギニンをセリンにそれぞれ置換したヒト ABCG4 の変異体を作製した。これらの変異体を HEK293 細胞に過剰発現させ、排出されるコレステロール量を測定したところ、変異体のコレステロール排出活性は野生型に比べて有意に低下することが明らかとなった。また変異体の細胞内局在を共焦点顕微鏡やビオチン化実験によって調べたところ、変異体は野生型と同様に細胞膜に局在し、CRAC 配列の変異がタンパク質の構造に影響を与えないことが分かった。このことから、CRAC 配列の変異は ABCG4 のコレステロール輸送能にのみ影響を与えることが示唆された。続いて基質認識に与える影響を詳細に解析するため、ABCG4 を精製し活性評価を行った。発現系は浮遊培養が可能な HEK293 細胞の派生株(FreeStyle293 細胞)を用い、可溶化には界面活性剤(Digitonin)、精製には FLAG タグを用いた。ABC タンパク質の ATP 加水分解活性は輸送基質によって促進されることが多い。そこで精製 ABCG4 を様々な脂質組成からなるリポソームに再構成して活性を検討した。その結果、DOPS からなるリポソームにコレステロールを添加すると、コレステロールの含量依存的に野生型 ABCG4 の ATP 加水分解活性が上昇することが明らかとなった。しかし、変異体の ATP 加水分解活性はコレステロールによって誘導されなかった。これらの結果から ABCG4 の TM6 に存在する CRAC 配列が、ABCG4 のコレステロール認識や、基質輸送する際の構造変化において重要であることが明らかとなった。

ABC protein, ABCG4, cholesterol

講演番号：2A02a02
講演日時：3 月 18 日 09:35～ A 校舎 02 会場

# Analysis of thermostabilizing mechanism of multidrug transporter

○Yilun WANG[1], Shuichi INOUE[1], Noriyuki KIOKA[1], Yasuhisa KIMURA[1], Kazumitsu UEDA[1,2]
([1]Div.Appl.Life Sci., Grad.Sch.of Agri., Kyoto Univ, [2]iCeMS., Kyoto Univ)

Multidrug resistance 1(MDR1, ABCB1) is a member of ABC transporters. MDR1 eliminates xenobiotic compounds with broad specificity by using energy of ATP binding and hydrolysis. MDR1 involves in protection from toxic compounds, affects pharmacokinetics of administrated drugs in our body and confers multidrug resistance in cancer cells. At this moment, due to its low thermostability, it is difficult to perform biophysical experiment such as crystallography or single molecule analysis. In contrast to human MDR1, CmABCB1, a homologue of human MDR1 from thermophilic algae (Cyanidioschyzon merolae), shows high thermostability and yields high-resolution crystal1. In CmABCB1 structure, N-terminal short α-helix (elbow helix) tightly interacts with transmembrane helices. In this study, we analyzed role of elbow helix in thermostability of CmABCB1 and human MDR1

<Results and Discussion> Elbow helix of CmABCB1 interacts with other transmembrane helices with hydrophobic surface and ionic bond with specific residues(R108 and D418). To weaken these interactions, charged amino acids were introduced into hydrophobic surface and ionic bond was disrupted by alanine substitution. Among these mutants, I109K and R108A showed lower thermostability compared to wildtype. Our results suggest that both hydrophobic and ionic interactions of elbow helix with transmembrane helices are important for the protein stability at high temperature in CmABCB1. Next, we introduced mutations in human MDR1 to strength the interaction between elbow helices and transmembrane helices. The residues of N704, Q143, R359 and K1002 were replaced with leucine to strength the hydrophobic interaction. S38 which is close to D370 in transmembrane helix 6, was replaced by arginine to form salt bridge with D370. Among these mutants, N704L and triple mutant (combination of S38R, Q143L and R359L) showed higher thermostability compared with wildtype. Our results suggest that the interactions around elbow helix is critical to thermostability of multidrug transporters.

1:Kodan et al, Proc Natl Acad Sci U S A.111:4049-54 (2014)

ABC protein, thermostability, helix interaction

講演番号：2A02a03
講演日時：3 月 18 日 09:50～ A 校舎 02 会場

# 脂質輸送タンパク質 ABCA1 とその機能調節タンパク質間の相互作用機構の解析

# Analysis for mechanisms of interactions between lipid transporter ABCA1 and its functional modulator proteins

○梶 友里恵[1]、藤林 果奈[2]、佐伯 和弘[1,2]、田口 善智[1,2]([1]近畿大院 生物理工、[2]近畿大 生物理工 遺伝子)
○Yurie KAJI[1], Kana FUJIBAYASHI[2], Kazuhiro SAEKI[1,2], Yoshitomo TAGUCHI[1,2] ([1]Div. of Gene. Engi., Grad. Sch. of Kindai Univ., [2]Div. of Gene. Engi., Kindai Univ.)

【目的】ABCA1 は、ABC(ATP Binding Cassette)輸送体に属する細胞膜局在タンパク質で、ATP の加水分解に依存して、細胞内のコレステロール等の脂質を細胞内から外へ輸送し、一般には善玉コレステロールとして知られている HDL の形成を促進する。ABCA1 は、細胞内外の様々な他のタンパク質と相互作用することにより、その機能が調節されることが明らかにされている。ABCA1 と相互作用するタンパク質として、細胞骨格と細胞との連結に機能するα1-syntrophin と、ビタミン E の一種であるα-トコフェロールと結合するα-TTP の 2 つの細胞質タンパク質に着目した。α1-syntrophin は ABCA1 と共発現させることにより、ABCA1 の細胞膜での半減期を延長させることができる。一方、ABCA1 は、α-TTP と共同することにより、α-トコフェロールを細胞外へ排出できることが示唆されている。ABCA1 とこれらのタンパク質との相互作用が、ABCA1 による ATP 加水分解にともなう構造変化に影響を受けるかを調べることを通じて、そのメカニズムを解析しようと試みた。具体的には ABCA1 の ATPase 活性を喪失した変異体と、α1-syntrophin、α-TTP との相互作用を共免疫沈降法により検討した。

【方法】マウス由来の ABCA1 とα1-syntrophin およびα-TTP のそれぞれの発現ベクターを構築した。また、細胞膜への局在は正常であるが、ATPase 活性を喪失して基質輸送ができない ABCA1 の変異体(K939M,K1952M の二重変異体(MM 変異体))の発現ベクターを構築した。作製したそれぞれの発現ベクターを、ヒト由来の培養細胞(HEK293)に導入した。それぞれのタンパク質を発現する細胞株より total cell lysate を抽出し、α1-syntrophin もしくはα-TTP が、野生型および変異体 ABCA1 との共免疫沈降法するのかを検討した。

【結果・考察】α1-syntrophin は、野生型 ABCA1 と共免疫沈降することが確認された一方で、変異体 ABCA1 と共沈するα1-syntrophin の量は、野生型との場合と比較して有意に減少していることがわかった。また、α-TTP は野生型 ABCA1 と共免疫沈降されたが、変異体の ABCA1 とはほとんど共沈しないことがわかった。以上の結果から、ABCA1 とα1-syntrophin 間およびα-TTP 間の相互作用には、ABCA1 の ATPase 活性が影響を及ぼすことが示唆された。

ABC protein, ABCA1, co-immunoprecipitation

発表責任者：田口善智（taguchi@waka.kindai.ac.jp）

講演番号：2A02a04
講演日時：3 月 18 日 10:05～ A 校舎 02 会場

マウス ES 細胞において抗がん剤排出タンパク質 BCRP1(ABCG2)と相互作用するタンパク質の探索
Screening for proteins which interact with anti-cancer drug transporter BCRP1 (ABCG2) in mouse embryonic stem cells

○岡迫 知弘[1]、青木 隆之介[1]、梶 友里恵[2]、西垣内 佑香[1]、桑山 萌[1]、坂手 祐貴[1]、甲田 美樹[1]、有田 奈央[1]、吉田 誠希[1]、松井 豪志[1]、奥田 宗広[1]、佐伯 和弘[1,2]、三谷 匡[2,3]、田口 善智[1,2] ([1]近畿大 生物理工 遺伝子、[2]近畿大院 生物理工、[3]近畿大 先端研)
○ Tomohiro OKASAKO[1], Ryunosuke AOKI[1], Yurie KAJI[2], Yuka NISHIGAITO[1], Moe KUWAYAMA[1], Yuuki SAKATE[1], Miki KOUDA[1], Nao ARITA[1], Motoki YOSHIDA[1], Takeshi MATSUI[1], Munehiro OKUDA[1], Kazuhiro SAEKI[1,2], Tasuku MITANI[2,3], Yoshitomo TAGUCHI[1,2] ([1]Div. of Gene. Engi., Kindai Univ., [2]Div. of Gene. Engi., Grad. Sch. of Kindai Univ., [3]Inst. Adv. Tech., Kindai Univ.)

【目的】BCRP1(Breast Cancer Resistance Protein1/ABCG2)は、ABC(ATP Binding Cassette)輸送体の一つで、ABC 輸送体に共有される 1 個の ATP 結合ドメインと 6 個の膜貫通ヘリックスから成る細胞膜局在タンパク質である。二量体で機能し、様々な種類の抗がん剤をはじめとする多様な化合物を細胞内から外へ輸送する活性をもつ。BCRP1 は、造血幹細胞やマウス由来の ES 細胞などの各種幹細胞において特異的に発現しており、幹細胞が分化するとその発現が低下することが多くの研究グループから報告されている。このことから、BCRP1 が幹細胞の未分化能維持に機能する可能性が示唆されているが、幹細胞において BCRP1 がどのような物質を輸送し、どうのよう機能を果たしているかは未だ明らかにされていない。そこで、マウス ES 細胞における BCRP1 の機能を明らかにすることを目的として、この細胞で BCRP1 と相互作用するタンパク質を Yeast Two Hybrid 法によって探索した。

【方法】マウス ES 細胞に由来する cDNA を prey、マウス BCRP1 の第 2 膜貫通ヘリックスと第 3 膜貫通ヘリックスの間の細胞内領域を bait として、BCRP1 と相互作用するマウス ES 細胞に発現するタンパク質を Yeast Two Hybrid 法によって探索した。探索の結果得られた陽性クローンにおいて prey プラスミドに含まれる cDNA 断片の塩基配列を調べ、複数の独立した陽性クローンに cDNA の断片が含まれていたタンパク質を相互作用する可能性のあるタンパク質とした。それぞれの ES 細胞における発現を確認した。さらに、それぞれのタンパク質の全長の cDNA を単離、発現ベクターに組み込み、マウス BCRP1 とともに HEK293 細胞に発現させ、BCRP1 と共免疫沈降するかを検討した。

【結果・考察】Yeast Two Hybrid 法によるスクリーニングの結果、がん抑制遺伝子産物でセリンスレオニンキナーゼである LKB1、およびγ-actin が BCRP1 と相互作用する可能性が示唆された。RT-PCR による解析の結果、LKB1 は未分化状態のマウス ES 細胞で強く発現するが、分化誘導されると発現が大きく低下することがわかった。一方、γ-actin は分化誘導の有無にかかわらず発現していた。HEK293 細胞に発現ベクターの導入により発現させた BCRP1 と LKB1、BCRP1 と HEK293 細胞に native に発現するγ-actin は、それぞれ共免疫沈降することが判明し、これらのタンパク質が相互作用することが示唆された。

ABC proteins, BCRP1, embryonic stem cells

発表責任者：田口善智（taguchi@waka.kindai.ac.jp）

講演番号：2A02a05
講演日時：3 月 18 日 10:20～ A 校舎 02 会場

# 乳酸菌由来脂肪酸によるコレステロールトランスポーターABCA1 と ABCG1 の活性化

# Stimulation of ABCA1 and ABCG1 by fatty acids produced by gut lactic acid bacteria

○吉井 未貴[1]、岸野 重信[2]、植田 和光[2,3]、小川 順[2]、松尾 道憲[1]([1]京女大家政、[2]京大院農、[3]京大 iCeMS)
○ Miki YOSHII[1], Shigenobu KISHINO[2], Kazumitsu UEDA[2,3], Jun OGAWA[2], Michinori MATSUO[1] ([1]Dep. of Home Econ., Kyoto Women's Univ, [2]Kyoto Univ. Grad. Sch. of Agri, [3]iCeMS, Kyoto Univ)

[目的]ABCA1 と ABCG1 はマクロファージをはじめとする末梢細胞に発現する ABC トランスポーターであり、コレステロールとリン脂質を排出することで高密度リポタンパク質(HDL)産生に関与する。乳酸菌がリノール酸を代謝して様々な脂肪酸を産生することが明らかとなり、それらの脂肪酸には様々な生理機能が期待されている。本研究では、乳酸菌由来の脂肪酸が ABCA1 と ABCG1 によるコレステロール排出活性に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。
[方法]ABCA1 と ABCG1 を発現させた BHK 細胞とマクロファージに分化させた THP-1 細胞に乳酸菌由来脂肪酸 25 種を添加し、ABCA1 と ABCG1 によるコレステロール排出活性、ABCA1 と ABCG1 の転写量、タンパク量、分解速度への脂肪酸の効果を調べた。
[結果]複数の乳酸菌由来脂肪酸によって ABCA1 と ABCG1 によるコレステロール排出活性が増加した。それらの脂肪酸添加によって、ABCA1 と ABCG1 のタンパク量の増加が見られた。その機構を明らかにするため、転写活性とタンパク分解速度を調べた。ABCA1 と ABCG1 の転写は少し増加し、タンパク分解速度は少し抑制されていた。従って、乳酸菌由来脂肪酸は複合的に作用することで ABCA1 と ABCG1 の量を増加させ、コレステロール排出を促進することが明らかとなった。ABCA1 と ABCG1 によるコレステロール排出は抗動脈硬化作用を持つことから、腸内細菌由来脂肪酸が動脈硬化抑制作用を持つ可能性がある。

ABC transporter, lactic acid bacteria, atherosclerosis

講演番号：2A02a06
講演日時：3 月 18 日 10:45～ A 校舎 02 会場

# 乳酸菌由来脂肪酸によるマクロファージにおける炎症抑制作用の解析

# Anti-inflammatory effects of fatty acids produced by gut lactic acid bacteria

○西岡 杏菜[1]、斎藤 貴将[2]、岸野 重信[2]、植田 和光[2,3]、小川 順[2]、松尾 道憲[1]([1]京女大家政、[2]京大院農、[3]京大 iCeMS)
○ Anna NISHIOKA[1], Takahiro SAITO[2], Shigenobu KISHINO[2], Kazumitsu UEDA[2,3], Jun OGAWA[2], Michinori MATSUO[1] ([1]Dep. Of Home Econ., Kyoto Women's Univ., [2]Kyoto Univ. Grad. Sch. of Agri., [3]iCeMS, Kyoto Univ.)

[目的]近年、腸内細菌叢と宿主の免疫ホメオスタシスやメタボリックシンドロームとの関連が多く報告されている。乳酸菌がリノール酸から水酸化脂肪酸、オキソ脂肪酸、共役脂肪酸などの様々な脂肪酸を産生することが明らかとなり、それらの脂肪酸はヒトの健康にも影響を与える可能性がある。これまでに、乳酸菌由来脂肪酸が腸管炎症を抑制することが報告されているが、動脈硬化の悪化因子となるマクロファージの炎症に対する効果は不明である。そこで、乳酸菌由来脂肪酸がマクロファージにおける炎症応答に及ぼす影響とメカニズムを明らかにすることを本研究の目的とした。
[方法]マクロファージに分化させたヒト THP-1 細胞に 28 種類の乳酸菌由来脂肪酸を添加し、リポポリ多糖によって誘導される炎症性サイトカインの発現量をリアルタイム PCR によって調べた。さらに炎症シグナル伝達に機能するタンパク質のリン酸化状態をウェスタンブロッティングで調べた。
[結果]28 種類のうち、10 種類の乳酸菌由来脂肪酸で IL-1, IL-6, TNF α などの産生が抑制されており、炎症抑制効果が確認された。それぞれの脂肪酸が炎症を抑制するメカニズムを調べるためシグナル伝達分子のリン酸化状態を検討し、炎症シグナル経路に関わる Raf のリン酸化を乳酸菌由来脂肪酸が抑えていることが示唆された。以上の結果から、乳酸菌由来脂肪酸はマクロファージにおける炎症を抑制し、動脈硬化抑制に機能する可能性がある。

inflammation, lactic acid bacteria, atherosclerosis

講演番号：2A02a07
講演日時：3 月 18 日 11:00～ A 校舎 02 会場

NPC1L1 の脂溶性物質結合活性の解析
Analysis of hydrophobic compounds binding of NPC1L1
○福田 恭子[1]、千場 智尋[2,3]、植田 和光[3,4]、松尾 道憲[1]（[1]京女大・家政、[2]ファンケル総研、[3]京大 iCeMS、[4]京大院・農）
○Kyoko FUKUDA[1], Tomohiro CHIBA[2,3], Kazumitsu UEDA[3,4], Michinori MATSUO[1] ([1]Dep. of Home Econ., Kyoto Women's Univ., [2]FANCL Research Institute, [3]iCeMS, Kyoto Univ., [4]Grad. Sch. of Agri., Kyoto Univ.)

【目的】小腸におけるコレステロールの吸収機構はながらく不明であったが、近年 NPC1L1 がコレステロール吸収に関与することがノックアウトマウスを用いた実験より明らかとなった。NPC1L1 はコレステロールだけではなく、ビタミン E やビタミン K の小腸での吸収にも関与することが報告されている。しかし、NPC1L1 タンパク自体がビタミンを結合して輸送するのかなど詳細は不明である。そこで、本研究では精製 NPC1L1 を用いて、コレステロールや脂溶性ビタミンの結合を比較しながら解析することを目的とした。
【方法】N 末端ドメインおよび全長 NPC1L1 を発現する HEK293F 細胞安定発現株をそれぞれ樹立した。さらにコレステロールを結合しないと報告されている変異体 2 種類（Q95A, P215AL216A）の安定発現株も樹立した。全長 NPC1L1 は細胞膜画分から界面活性剤で可溶化した後、His タグを利用し、Ni-Resin で精製した。N 末端ドメイン NPC1L1 は、培地中に分泌されたものを Ni-Resin で精製した。
【結果】全長 NPC1L1 を界面活性剤 CHAPS で可溶化することができた。野生型と 2 種類の変異体ともに同程度に粗精製することができた。N 末端ドメイン NPC1L1 変異体の野生型と変異体の精製を行い、ステロール結合能を RI ラベルしたオキシステロールと non-RI コレステロールを酵素法で調べることで解析した。その結果、野生型ではステロール結合が見られたが変異体では結合が見られなかった。現在精製した N 末端ドメイン NPC1L1 を用いて、ビタミン E とビタミン K の結合能を調べている。

cholesterol, vitamin, transporter

講演番号：2A02a08
講演日時：3 月 18 日 11:15～ A 校舎 02 会場

# 哺乳動物細胞小胞体内における LDL 受容体新生ポリペプチド鎖の酸化的フォールディング機構の解析

# Mechanisms of oxidative folding of LDL receptor polypeptide chains elongating from the ribosome

太宰 結、中村 織江、稲葉 謙次、○門倉 広（東北大多元研）
Yui DAZAI, Orie NAKAMURA, Kenji INABA, ○Hiroshi KADOKURA (Tohoku Univ.)

ジスルフィド結合の形成は多くの生物において分泌タンパク質や膜タンパク質の立体構造形成や機能発現に重要である。哺乳動物細胞の小胞体内にはこの過程に関わると予想される PDI ファミリータンパク質が 20 種類も存在する。しかし、小胞体中に送り込まれてきたタンパク質のポリペプチド鎖に対して、これらの酵素がいつ、どのようにしてジスルフィド結合を導入するのかについてはほとんど分っていない。この仕組みを解明するために私たちは LDL 受容体(LDLR)をモデル基質のひとつとして用いている。LDLR は多数のドメインからなる一回膜貫通タンパク質であり、LDLR 分子上にジスルフィド結合は、7 個の Ligand binding domain と 3 個の EGF-like domain の各々に 3 個ずつ、計 30 個存在する。私たちは様々な工夫の結果、リボソーム上で翻訳合成されつつ小胞体内で伸長する LDLR のポリペプチド鎖にジスルフィド結合が導入される過程を観察するための系を構築することに成功した。この系を利用することによって、1) LDLR へのジスルフィド結合の導入は翻訳と共役して起こりうること、2) 翻訳と共役しておこる LDLR の酸化的なフォールディング反応は 3 つのフェーズに分けられること、3) そのうちの第 1 と第 2 のフェーズは、LDLR の N 末端近傍に存在する 7 個の Ligand binding domain のそれぞれにジスルフィド結合が導入される反応にともなって観察されるものであること、4)第 3 のフェーズは LDLR の中央部分に存在する 3 個の EGF-like domain にジスルフィド結合が導入される反応にともなうものであることなどを、示唆する結果を得た。以上の結果から、小胞体上のリボソーム上で合成されつつ小胞体内に送り込まれてくる LDLR のポリペプチド鎖にジスルフィド結合が導入されうることが初めて直接的に示された。また、これら 3 つのフェーズは新生ポリペプチド鎖の長さに強く依存して段階的に進行することから、小胞体内におけるタンパク質のフォールディング反応はリボソーム上でのポリペプチド鎖の伸長反応と共役して進行しうることが示唆された。これらの点も含めて、得られた結果から予想される小胞体内におけるタンパク質のフォールディング反応の仕組みについて議論したい。

ER, Disulfide bond, PDI

発表責任者：門倉　広（kadokura@tagen.tohoku.ac.jp）

講演番号：2A02a09
講演日時：3 月 18 日 11:30～ A 校舎 02 会場

# 小胞体ストレス応答に関与する XBP1u が SRP 経路に入る為の条件解析

# Condition analysis for XBP1u of entering SRP pathway

○桶谷 真希、曽川 愛守榮、大古殿 美加、苅田 聡、河野 憲二 (奈良先端大バイオ)
○Maki OKETANI, Ashway SOGAWA, Miku OHFURUDONO, Satoshi KANDA, Kenji KOHNO (NAIST)

小胞体ストレス応答の IRE1α -XBP1 経路において、転写因子前駆体をコードする XBP1u mRNA は小胞体膜上に運ばれ、ストレス時には活性化した小胞体ストレスセンサーIRE1α により特殊スプライシングを受け、成熟型転写因子 XBP1s を産生する。XBP1s は小胞体に蓄積した変性タンパク質を解消する反応に関わる分子や脂質合成酵素の転写を誘導することで小胞体の恒常性維持に寄与している。一方、この径路で XBP1u mRNA がどのような機構で小胞体膜に運ばれているかを調べたところ、合成途上の XBP1u タンパク質が、自身の小胞体輸送シグナル HR2 と翻訳休止配列（PS: pausing sequence ）を使い SRP 経路を利用して運んでいることが明らかとなった（PNAS , 2016)。ヒト XBP1u の翻訳休止配列はC 末端 26 アミノ酸残基からなり、ribosome profiling により最終アミノ酸 Asn がリボソームの A サイトで停止していることが報告されている。その上流 27 アミノ酸残基をはさみ、22 アミノ酸残基からなる小胞体輸送シグナルがある。さらに XBP1u が翻訳停止すると、リボソームトンネル内には約 40 アミノ酸存在することが、Mal-PEG を用いた我々の研究から明らかとなっている。これらのデータを基に考えると、XBP1u が翻訳休止すると、小胞体輸送シグナルはリボソームの出口から 13 アミノ酸上流の位置にあることになる。

XBP1u が小胞体膜上に SRP 経路を使って局在することは既に述べたが、これは通常の SRP 経路への認識のされ方が次の２点で異なることがわかっている。通常はシグナルペプチドがリボソームトンネルから出ると、SRP は直ちに結合し、その結果一時的な翻訳停止が起きるが、XBP1u のシグナルペプチドが SRP に認識されるためには、翻訳休止が必須である。２点目として、シグナル配列は翻訳されると SRP によってリボソーム出口付近で認識されるが、XBP1 のシグナル配列 HR2 は、上記に述べたようにリボソームから完全に露出した状態で SRP の認識を受ける。

我々は、XBP1u の HR2 とリボソームトンネル出口からの距離により、SRP の認識にどのような差がみられるかに興味をもち、その間のアミノ酸残基を系統的に短くした場合、逆に長くした場合について解析することにした。本発表では、系統的に短くした場合の結果について報告する。

srp pathway, Xbp1, signal peptide

講演番号：2A02a10
講演日時：3 月 18 日 11:45～ A 校舎 02 会場

膵島β細胞における阻害剤をもちいた IRE1α の機能解析
The analysis of the function of IRE1α in pancreatic βcells
○佐藤 仁美[1]、芝 陽子[2]、土屋 雄一[1]、斉藤 美知子[1]、河野 憲二[1] ([1]奈良先端大バイオ、[2]岩手大理工学部化学生命理工学科生命コース)
○Hitomi SATO[1], Yoko SHIBA[2], Yuichi TSUCHIYA[1], Michiko SAITO[1], Kenji KOHNO[1] ([1]NAIST, [2]Iwate Univ.)

小胞体では、分泌タンパク質や膜タンパク質の生合成がおこなわれている。このとき、正常に折りたたまれたタンパク質は目的地へと運ばれるが、正しく折りたたまれず、構造異常となったタンパク質は小胞体内に留められる。様々な環境の変化により小胞体内に構造異常のタンパク質が蓄積すると、凝集体を形成し小胞体の機能を低下させる。このような状態を小胞体ストレスと呼ぶ。小胞体ストレスセンサーの一つである IRE1α は、細胞質ゾル側に RNase ドメインをもち、小胞体内腔ドメインで小胞体ストレスを感知すると、RNase ドメインが活性化し、標的である XBP1u mRNA のスプライシングをおこなう。スプライシングを受けた XBP1s mRNA は、活性をもった転写因子として翻訳され、小胞体シャペロン、小胞体関連分解因子や脂質合成酵素などの制御下の遺伝子を転写誘導し、小胞体ストレスの緩和を促す。

膵島β細胞は、インスリンを合成･分泌する分泌細胞であり、体内の血糖コントロールに欠かせない。膵島β細胞の機能低下および細胞死は、恒常的な高血糖つまり糖尿病を引き起こす。近年、膵島β細胞の機能低下や細胞死に小胞体ストレス応答が密接に関与していることが報告されている。興味深いことに、マウス個体では膵臓ランゲルハンス島においては生理的条件下においても XBP1u mRNA のスプライシングが誘導されていることを我々は見いだした。さらに、膵島β細胞特異的に IRE1α をノックアウトしたマウスでは、血中インスリン濃度の低下により、糖尿病様症状を示した。しかし、これまでの過去の研究はすべて IRE1α をノックアウトした後にかなり時間が経過してから解析されたものであり、他のストレス応答（小胞体ストレスや酸化ストレス）の代償的活性化などが確認されており、IRE1α のインスリン産生における直接的な働きを解析できていない。そこで、本研究では IRE1α の機能阻害による影響をいち早く解析するため、IRE1α の RNase ドメイン特異的阻害剤である 4μ8C をもちいた。4μ8C 処理により、マウス膵島β細胞および初代培養の膵島において IRE1α を阻害するとただちに分泌が著しく阻害されることが明らかとなった。また、このときインスリンの合成や成熟への影響は見られなかった。これらのことから、4μ8C による IRE1α の阻害はインスリンのエキソサイトーシスに影響している可能性が考えられた。その解明に向けて解析を進めたところ、IRE1α の RNase ドメイン特異的阻害剤であるはずの 4μ8C には重大な副作用があることを示す結果が得られた。近年、IRE1α 阻害剤は糖尿病治療薬としてだけでなく抗がん剤への応用が期待されている。そのため、本研究は IRE1α 阻害剤とその応用を考慮する上で重要な課題を提示していると考えられる。

ER stress, IRE1α, Insulin

講演番号：2A02p01
講演日時：3 月 18 日 14:00～ A 校舎 02 会場

# 新規蛍光プローブ SPiDER-βGal による細胞老化マーカーSA-β-gal の迅速検出

# Rapid detection of cellular senescence marker SA-ß-gal by a novel fluorescent probe SPiDER-ßGal

○小松 恭佳（同仁化学研究所）
○Yasuka Komatsu (Dojindo Laboratories)

【背景・目的】

細胞は分裂を繰り返していくと不可逆的に分裂を停止する。これを細胞老化と呼び、がん化を抑制するための防御機構の一つと考えられている。また近年、細胞老化と個体老化の関連が示唆されており、細胞老化研究は活発になっている。

細胞老化マーカーの一つとして senescence-associated β-galactosidase(SA-β-gal)が用いられている。SA-β-gal を検出するには、5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactoside(X-gal)を用いた比色法が汎用されているが、この手法の問題点として、1)染色された細胞とそうでない細胞の判別を目視により行うため定量性に欠ける、2)細胞を固定化する必要がある、3)染色に時間を要する、などが挙げられる。これらの問題点を解決するため、今回我々はβ-ガラクトシダーゼ活性を検出するための新規蛍光プローブ SPiDER-βGal を使用した SA-β-gal の迅速検出を試みた。

【実験・結果】

今回、過酸化水素や *tert*-ブチルヒドロペルオキシドによって細胞老化を誘導した WI-38 細胞に対して本プローブを使用し、蛍光イメージングおよびフローサイトメトリーによる SA-β-gal の迅速検出を試みた。その結果、SPiDER-βGal は、細胞膜を透過するため生細胞への適用が可能であった。また、SPiDER-βGal は、プローブ添加後 15 分のインキュベートで、細胞内のβ-ガラクトシダーゼと反応後、強い蛍光を発し、同時に周辺のタンパク質と結合するため細胞外に漏出しないという特長が確認された。

以上の事から、SPiDER-βGal は、生細胞中の SA-β-gal を短時間に、且つ明瞭に蛍光検出できることが確認された。更にはフローサイトメトリー測定により、SA-β-gal を簡便かつ定量的に検出することが可能であった。

cellular senescence, SA-ß-gal, fluorescence imaging

発表責任者：小松恭佳（y.komatsu@dojindo.co.jp）

講演番号：2A02p02
講演日時：3 月 18 日 14:15～ A 校舎 02 会場

ビネキシンのホスファチジン酸結合領域の解析
Analysis of the binding region of vinexin to phosphatidic acid
○伊藤 有亮[1]、市川 尚文[1]、折田 雄一郎[1]、安部 真人[1]、木村 泰久[1]、植田 和光[1,2]、三芳 秀人[1]、木岡 紀幸[1]([1]京大・農、[2]京大・iCeMs)
○YUSUKE ITO[1], TAKAFUMI ICHIKAWA[1], YUICHIRO ORITA[1], MASATO ABE[1], YASUHISA KIMURA[1], KAZUMITSU UEDA[1,2], HIDETO MIYOSHI[1], NORIYUKI KIOKA[1] ([1]Grad. Sch. of Agri., Kyoto Univ., [2]iCeMS, Kyoto Univ.)

近年、動物細胞を取り囲むコラーゲンなどの細胞外マトリックス（ECM）の硬さは細胞の増殖や遊走、分化などの運命を制御することが明らかになってきた。接着斑に局在するタンパク質であるビンキュリンとビネキシンαは、ECM の硬さに依存して互いに相互作用し、ビンキュリンの構造変化を引き起こす事で細胞運動を制御するメカノセンサーとして機能する。さらに、ビンキュリンは ECM の硬さに依存した脂肪細胞分化の調節にも関与している。また、ビンキュリンやビネキシンαがメカノセンサーとして機能するためには、コレステロールやスフィンゴミエリンを豊富に含む微小細胞膜ドメインである脂質ラフトに局在することが必要である。このうち、ビンキュリンの脂質ラフト局在にはビネキシンα及びホスファチジルイノシトール二リン酸（$PIP_2$）との結合が必要であることが分かっているが、ビネキシンαの脂質ラフト局在化の仕組みや脂質との結合については不明である。そこで本研究では、ビネキシンαが脂質と直接結合する可能性について精製タンパク質を用いて検証した。

まず､様々な種類の脂質を固定したポリフッ化ビニリデン（PVDF）膜と精製 GST-ビネキシンαを混合し、protein-lipid overlay assay を行った。その結果、ビネキシンαと酸性リン脂質であるホスファチジン酸（PA)との結合が検出された。一方で、ビネキシンαと別の酸性リン脂質であるホスファチジルセリンや $PIP_2$ との結合は見られなかった。ビネキシンαの N 末端側領域を欠失したスプライシングバリアントであるビネキシンβは、ECM の硬さ感知に関与しないことが分かっている。そこで、ビネキシンβについても同様に protein-lipid overlay assay を行った。その結果、ビネキシンβと PA との結合は検出されなかった。次に、ホスファチジルコリン(PC)のみを含むリポソームと PA を 20%含む PA/PC リポソームを作製し、精製 GST-ビネキシンαとの共沈降実験を行った。その結果、ビネキシンαは PC リポソームに比べ、PA/PC リポソームと効率よく共沈降した。このことから、ビネキシンαは PA と特異的に結合することが分かった。さらに、PA との結合領域を絞り込むために、ビネキシンβには含まれないビネキシンαの N 末端側領域を欠損させた様々な変異体を用いてリポソームとの共沈降実験を行った。その結果、機能未知ドメインである SoHo(Sorbin Homology)ドメインを欠損させた変異体は PA/PC リポソームと共沈降しなかった。また、SoHo ドメイン内のアミノ酸に点変異を導入した変異体も PA/PC リポソームと共沈降しなかった。以上の結果から、ビネキシンαは SoHo ドメインを介して PA と特異的に結合する可能性が示唆された。

focal adhesion, vinexin, phosphatidic acid

講演番号：2A02p03
講演日時：3 月 18 日 14:30～ A 校舎 02 会場

# ビネキシンαの両親媒性ヘリックスはビンキュリンの構造変化に必要である

# Amphipathic helix of vinexin α is necessary for conformational change of vinculin

○日野 直也[1]、市川 尚文[1]、木村 泰久[1]、植田 和光[1,2]、木岡 紀幸[1]([1]京大・農・応生、[2]京大・iCeMS)
○Naoya HINO[1], Takafumi ICHIKAWA[1], Yasuhisa KIMURA[1], Kazumitsu UEDA[1,2], Noriyuki KIOKA[1] ([1]Div. App. Life Sci., Grad. Sch. of Agri., Kyoto Univ., [2]iCeMS, Kyoto Univ.)

【背景・目的】接着斑タンパク質ビンキュリンは硬い細胞外マトリックス（ECM）上で構造変化し、ECM の硬さ依存的な細胞遊走や脂肪細胞分化を制御する。また、この構造変化には別の接着斑タンパク質であるビネキシンαとの相互作用が必要である。ビネキシンαに含まれる SH3 ドメインはビンキュリン相互作用領域として知られており、この領域がビンキュリンの構造変化の誘導に必要である。しかし、この領域のみでは構造変化を誘導できず、さらなる制御機構の存在が予想されている。近年、我々はビネキシンαの新たなビンキュリン相互作用領域として両親媒性ヘリックス H2 を同定した。そこで、本研究ではビネキシンαによるビンキュリンの構造変化機構を明らかにするため、両親媒性ヘリックス H2 に注目し、この領域がビンキュリンの構造変化に与える影響を解析した。
【方法･結果】ビネキシンαの H2 領域にアミノ酸置換を導入した変異体（H2Q 変異体）を作成した。この変異体の GST 融合精製タンパク質と、ビンキュリンの構造変化を検出できる蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）プローブ型のビンキュリンを用いて *in vitro* での解析を行った。野生型ビネキシンαはビンキュリンの構造変化を引き起こしたが、H2Q 変異体では構造変化を引き起こす効果が減少した。構造変化したビンキュリンはアクチン繊維との親和性が上昇することが知られている。野生型ビネキシンαは濃度依存的にアクチン繊維と共沈降するビンキュリンを増加させたが、H2Q 変異体では増加効率が減少した。次に、H2 領域のみを GST 融合タンパク質として精製し、ビンキュリン FRET プローブを用いた解析を行ったところ、H2 領域単独ではビンキュリンの構造変化を引き起こさなかった。このことから、ビネキシンαが引き起こすビンキュリンの構造変化には H2 領域と SH3 ドメインの両方が必要であることが示唆された。次に、ECM の硬さ依存的なビンキュリンの構造変化に、H2 領域が与える影響を細胞内で解析した。そのために、ビネキシン欠損マウス線維芽細胞に野生型ビネキシンαと H2Q 変異体を再発現させた細胞株を樹立した。ビンキュリンは細胞内で構造変化すると、アクチン繊維との親和性が上昇し、界面活性剤 Triton X-100 を含む緩衝液で洗い流されにくくなるという性質を持つ。野生型ビネキシンα再発現細胞では柔らかい ECM 上に比べ、硬い ECM 上で Triton 耐性ビンキュリンが増加したのに対し、H2Q 変異体再発現細胞では増加しなかった。以上の結果から、ECM の硬さ依存的なビンキュリンの構造変化には、ビネキシンαに含まれる SH3 ドメインだけでなく両親媒性ヘリックス H2 も必要であることが明らかになった。

focal adhesion, vinculin, mechanosensing

講演番号：2A02p04
講演日時：3 月 18 日 14:45～ A 校舎 02 会場

細胞収縮力発生におけるビネキシンファミリータンパク質の役割
Vinexin family proteins play different roles in contractile force generation

○市川 尚文[1]、松井 翼[2,3]、荒木 智彦[3]、喜多 真弘[1]、植田 和光[1,4]、出口 真次[2,3]、木岡 紀幸[1]（[1]京大農、[2]阪大基礎工、[3]名工大工、[4]京大 iCeMS）
○Takafumi ICHIKAWA[1], Tsubasa MATSUI[2,3], Tomohiko ARAKI[3], Masahiro KITA[1], Kazumitsu UEDA[1,4], Shinji DEGUCHI[2,3], Noriyuki KIOKA[1] ([1]Grad. School of Agri., Kyoto Univ., [2]Grad. School of Engi. Sci., Osaka Univ., [3]Nagoya Inst. of Tech., [4]iCeMS, Kyoto Univ.)

【背景・目的】動物細胞内に発生する細胞収縮力は自身の運動や形態形成に必須であり、発生や組織の恒常性に重要な役割を担っている。最近では、細胞が細胞外微小環境の硬さを感知する際にも、細胞収縮力を巧みに調節していることがわかってきた。これまでに私たちは細胞外微小環境の硬さの感知に、細胞接着斑局在タンパク質であるビネキシンα（SORBS3）が必要であることを明らかにしてきた。また、ショウジョウバエにおけるビネキシンオーソログである dCAP は強い力のかかる器官の発生に必須であることから、ビネキシンファミリー（SORBS）タンパク質は細胞収縮力の発生にも関与する可能性がある。哺乳類では SORBS タンパク質としてビネキシンαに加えて CAP（SORBS1），ArgBP2（SORBS2）が同定されているが、多くの細胞では 2 種類以上の SORBS タンパク質を発現しており、個々の機能について詳細に比較解析されたことはない。本研究では SORBS タンパク質を単独で発現するマウス線維芽細胞（MEF）を用いて SORBS タンパク質の細胞収縮力発生における役割を調べた。
【方法・結果】まず、SORBS タンパク質三重欠損マウス線維芽細胞（TKO MEF）にビネキシンα，CAP，ArgBP2 を単独で再発現した細胞を樹立した。力が加わるとシワを形成するシリコーンゲルを作製し、その上に細胞を播種した。細胞が作り出したシワを位相差顕微鏡で撮影し、画像解析により一細胞が生み出すシワの総長さを定量化したところ、ArgBP2 再発現細胞でのみ有意にシワの総長さが増加していた。細胞収縮力はミオシン調節軽鎖（MRLC）のリン酸化により増大することから、各再発現細胞におけるリン酸化 MRLC を蛍光免疫染色し、定量化した。ビネキシンα，CAP 再発現細胞でもリン酸化 MRLC は増加していたが、ArgBP2 再発現細胞では特に顕著に増加していた。このことから ArgBP2 発現によるリン酸化 MRLC の著しい増加が、細胞収縮力の増大につながっていることが示唆された。次に、ArgBP2 による細胞収縮力増加のメカニズムを明らかにするため、ArgBP2 と結合することが報告されているアクチン繊維架橋タンパク質α-アクチニンに注目した。α-アクチニンはアクチン繊維上で安定化すると、細胞収縮力を増大させることが知られている。α-アクチニンのアクチン繊維上での安定性に与える影響を光褪色後蛍光回復法で調べたところ、ビネキシンαと CAP は効果を示さなかったが、ArgBP2 の発現はα-アクチニンをアクチン繊維上で安定化した。また、プルダウン実験によりビネキシンαや CAP はα-アクチニンと共沈降しなかったが、ArgBP2 はα-アクチニンと共沈降した。これらのことから、SORBS タンパク質のうち、ArgBP2 のみがα-アクチニンを介して細胞収縮力の増大に関与していることが示唆された。

vinexin, contractile force, myosin

発表責任者：市川尚文（takachan@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A02p05
講演日時：3 月 18 日 15:00～ A 校舎 02 会場

G-actin に対する人工抗体の細胞導入と機能評価
Functional analyses of bicyclic peptides for G-actin
○町田 奈々子[1]、秋山 祐亮[2]、村上 寛和[2]、Heinis Christian[3]、Bertoldo Davide[3]、山崎 祥他[2]、原田 昌彦[1,2] ([1]東北大農、[2]東北大院農、[3]EPFL・LPPT)
○ Nanako Machida[1], Yusuke Akiyama[2], Hirokazu Murakami[2], Christian Heinis[3], Davide Bertoldo[3], Shota Yamazaki[2], Masahiko Harata[1,2] ([1]Tohoku Univ., [2]Grad. Sch.,Tohoku Univ., [3]EPFL・LPPT)

アクチンは全ての真核生物に大量に存在し、酵母からヒトまで進化的に高度に保存されたタンパク質の一つである。細胞内のアクチンは、単量体の globular(G)-アクチン、あるいは重合した繊維状の filamentous(F)-アクチンの形態で存在し、細胞分裂・形態変化・遊走など様々な生命現象に寄与している。近年、細胞核内の G-アクチンがクロマチンリモデリング複合体の構成因子として転写制御に関与すること、さらに主要な細胞内シグナルである SRF や Wnt シグナルの制御にも重要な役割を持つことが報告された。しかし、G-アクチン特異的に結合するプローブや抗体が存在しないことから、その詳細なメカニズムの解明が困難であった。これらの背景から、本研究では G-アクチン特異的な結合を示す人工抗体である”Bicyclic peptide”のスクリーニングと解析を行なった。

共同研究者である Christian Heinis によって開発された bicyclic peptide[1)]は、一定間隔に三つのシステインが挿入された 20 残基程度のペプチドで、TBMB などのリンカーとシステイン残基間でジスルフィド結合を誘導することで二つの環状構造を形成する。この二つの環状構造により、標的分子への高いアクセシビリティと結合力を有する。また人工的な化学合成が可能であることから、新規分子プローブとしての利用や創薬への応用が期待されている。

これまで、本研究では、この G-アクチン特異的な bicyclic peptide (G-actin-BP) を用いて、細胞内アクチンへの結合性評価と細胞へ与える影響を解析した。G-actin-BP をエレクトロポレーションによって導入した細胞の顕微鏡観察の結果、G-actin-BP は G-アクチンと細胞核を含む領域で共局在している一方、F-アクチンとは共局在しないことが示された。また、G-actin-BP はミカロライド B (アクチン重合阻害剤、F-アクチン切断) と同じアクチン部位に結合するが、ミカロライド B とは異なり、G-actin-BP による F-アクチンの切断は観察されなかった。しかし、M 期同調後の HeLa 細胞に G-actin-BP を導入すると、多核細胞の増加が観察されたことから、G-actin-BP がアクチン重合による収縮管の形成を抑制することが示唆された。以上より G-actin-BP は、細胞内で G-アクチン特異的に結合を示し、新規 F-actin 形成だけを抑制する新規なプローブになる可能性がある。さらに、このような G-actin-BP の特性は、核内アクチンの機能解析にも有用であり、現在その研究を進めている。

1）Heinis、C. et al., Nat Chem Biol., 5(7):502-7 (2009)

Actin, Bicyclic peptide, Artificial antibody

講演番号：2A02p06
講演日時：3 月 18 日 15:25～ A 校舎 02 会場

# カルシウム結合タンパク質 ALG-2 とアポトーシス促進タンパク質 CDIP1 と Scotin の相互作用
# Interactions between a calcium-binding protein ALG-2 and pro-apoptotic proteins CDIP1 and Scotin

○犬飼 隆太[1,2]、鈴木 千尋[1,2]、京 卓志[1,2]、清水 育美[1]、高原 照直[1,2]、柴田 秀樹[1,2]、牧 正敏[1,2] ([1]名大院生命農、[2]日本農芸化学会)
○Ryuta Inukai[1,2], Chihiro Suzuki[1,2], Takashi Kanadome[1,2], Ikumi Shimizu[1], Terunao Takahara[1,2], Hideki Shibata[1,2], Masatoshi Maki[1,2] ([1]Nagoya Univ., [2]Nihon Nougeikagaku Gakkai)

ALG-2 (apoptosis-linked gene 2) はアポトーシスに必要な遺伝子産物として発見された、分子内に EF-hand を 5 つもつカルシウム結合タンパク質である。アポトーシスにおける ALG-2 の役割の詳細は現在のところ不明である。我々は ALG-2 の生理機能を解明する目的で、その相互作用タンパク質を多数同定してきた。CDIP1 (Cell death-inducing p53 target protein 1) はアミノ末端のプロリンに富んだ領域中に、ALG-2 との結合が予想されるモチーフ（ABM-2, ALG-2-binding motif 2）を持つ。

CDIP1 は DNA 傷害に応答して p53 により発現が上昇するタンパク質であり、アポトーシスを誘導する。また、小胞体ストレスにより p53 非依存的に誘導され、caspase-8 の活性化を介してアポトーシスを引き起こすことが知られている。免疫沈降実験により ALG-2 と CDIP1 の結合を解析したところ、その結合はカルシウム依存的であり、CDIP1 の ABM-2 が重要であることが明らかとなった。

ALG-2 はカルシウム依存的なアダプタータンパク質として機能するため、既知の ALG-2 相互作用タンパク質から CDIP1 の相互作用タンパク質を探索したところ、CDIP1 は 1 回膜貫通領域を持った SHISA family タンパク質 SHISA4, Scotin とも結合した。Scotin は CDIP1 と同様、p53 誘導性のタンパク質でありアポトーシスを誘導する。CDIP1 との結合様式について解析すると、SHISA4, Scotin は CDIP1 のシステインに富んだ領域を含むカルボキシ末端領域と結合することが明らかとなった。

さらに種々の培養細胞株を用いて DNA 障害および小胞体ストレスを引き起こす薬剤処理による ALG-2,CDIP1,Scotin の発現変動と細胞内局在について解析を現在進めている。蛍光タンパク質を融合させた Scotin と CDIP1 は U2OS 細胞において小胞体様の局在を示したことから、Scotin と CDIP1 が小胞体膜上で複合体を形成し、アポトーシスの制御に関与する可能性を考えている。

Calcium-binding protein, Apoptosis, Potein-protein interaction

発表責任者：犬飼隆太（inukai.ryuta@e.mbox.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2A02p07
講演日時：3 月 18 日 15:40～ A 校舎 02 会場

# 小胞体でのミスフォールドタンパク質蓄積に伴うレドックス異常回復剤の同定とその機序について
# Identification of redox modulators which can restore the abnormal ER redox state caused by aberrant protein accumulation

○奥 勇紀[1]、奥野 友紀子[2]、萩原 正敏[2]、寶関 淳[3,4]、阪井 康能[3,4] ([1]京大院・総合生存、[2]京大院医、[3]京大院農・応用生命、[4]京大・生理化学)
○Yuki OKU[1], Yukiko OKUNO[2], Masatoshi HAGIWARA[2], Jun HOSEKI[3,4], Yasuyoshi SAKAI[3,4] ([1]Grad. Sch. of Adv. Int. Studies., Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. of Med, Fac. of Med., Kyoto Univ., [3]. Div. of Applied. Life Sci., Grad. Sch. of Agri., Kyoto Univ., [4]Research Unit for Phy. Chem., Kyoto Univ.)

小胞体は分泌及び膜タンパク質のフォールディングの場であり、フォールディングを受けるタンパク質は、糖鎖修飾やジスルフィド結合形成などの翻訳後修飾を受けながら成熟する。小胞体は厳格なタンパク質品質管理機構を有しており、正しくフォールドされたもののみが分泌経路へ送られ、そうでないものは小胞体内に留められリフォールディングされる。それでもフォールディングできないものはサイトゾルへと逆行輸送され、ユビキチン・プロテアソーム系で分解される。小胞体でフォールディングされるタンパク質の多くはその構造形成や機能発現にジスルフィド結合を必要とし、そのため小胞体は酸化的な環境にある。小胞体レドックスの恒常性維持は小胞体タンパク質品質管理において必須であり、その破綻は小胞体ストレスを引き起こすが、その恒常性維持機構は解明されていない。

最近、我々は小胞体において安定に発現し、そのレドックス状態を可視化できるタンパク質性の蛍光レドックスプローブである ERroGFP S4 を開発した(Hoseki *et al.*, 2016)。ERroGFP S4 を用いて小胞体における異常タンパク質蓄積に伴う小胞体レドックス変化を計測したところ、小胞体レドックス状態がより酸化的となった。

本研究は、ミスフォールドタンパク質の小胞体蓄積に伴うレドックス異常を正常化する化合物を同定し、その作用機序を同定することでレドックス異常が引き起こされる機構を解明することを目的とした。小胞体におけるレドックス異常を正常化する化合物「レドックスモジュレーター」のハイスループット・スクリーニングを行うため、多数の細胞における定量データを取得できるハイコンテント・アナリシス (HCS)を適用した。小胞体に蓄積し、そのレドックス状態を酸化的にする 2 種類の基質、インスリン変異体および免疫グロブリンの joint chain (J chain)を過剰発現させた細胞において、FAD で認可されている 2480 種類の化合物を探索し、小胞体内の酸化を抑制する 8 種類の化合物を同定した。現在、スクリーニングで同定された化合物のレドックスモジュレーターとしての効果を共焦点顕微鏡において定量することで検証しながら、その作用機序を解析しており、その結果についても報告する予定である。

ER-stress, Redox state, Drug screening

講演番号：2A02p08
講演日時：3 月 18 日 15:55～ A 校舎 02 会場

# 高浸透圧ストレス誘導性オートファジーの形態および分子メカニズムの解析

# Molecular mechanisms of hypertonicity-induced autophagy

○田村 直輝、和栗 聡（福島医大・医）
○Nokai TAMURA, Satoshi WAGURI (Fukushima Med. Univ.)

浸透圧ストレスは最も広く知られたストレスの一つで、哺乳類では泌尿器系などの組織で日常的に起きる。今回、我々はマウス胎仔由来線維芽細胞(MEF)において、高浸透圧ストレスが一種のオートファジーを誘導することを見出した。等張圧下では細胞質に一様に分布していた WIPI-1/2 は、高浸透圧環境下で培養することにより強いドット状の局在を示した。この局在変化はアミノ酸飢餓による誘導と比べて短時間で起こり、ドットの形態パターンも異なっていた。また、この WIPI-1/2 陽性ドットには隔離膜マーカーである Atg16L や Atg9 小胞を示す Atg9a が共局在し、電子顕微鏡でもオートファゴソーム様構造が観察された。一方、飢餓誘導オートファジーに必要な FIP200 を欠損する MEF を解析した結果、同タンパク質は高浸透圧誘導性オートファジーには必須ではなかった。さらに、この現象は悪性メラノーマ由来の G361 細胞を始めとするヒト培養細胞株でも観察されたことから、ヒト細胞でも保存された現象であることが示唆された。

autophagy, osmotic stress, stress response

発表責任者：田村直輝（tamura-n@fmu.ac.jp）

講演番号：2A02p09
講演日時：3 月 18 日 16:10～ A 校舎 02 会場

# リソソーム関連タンパク質の細胞内局在性の解析

Analysis of intracellular localization of lysosome-related proteins

○家治 葉子、桑田 沙羅、片岡 孝夫（京工繊）
○Yohko YAJI, Sara KUWADA, Takao KATAOKA (Kyoto Inst. Tech.)

【目的】リソソームは、膜内に加水分解酵素を含み、細胞内外の物質の細胞内消化やオートファジーに関わる細胞小器官である。主要なリソソーム膜タンパク質として、LAMP (lysosome-associated membrane protein)ファミリーが知られている。一方、リソソームの中で、細胞外へ分泌されるものは分泌型リソソームと呼ばれる。細胞傷害顆粒は分泌型リソソームの一つで、可溶性タンパク質としてポア形成タンパク質 perforin やセリンプロテアーゼ granzyme B を含み、がん細胞やウイルス感染細胞に対する殺傷機能を持つ。シグナルペプチドペプチダーゼをコードする minor histocompatibility 13 (HM13)や p24 積み荷受容体ファミリーに属する transmembrane protein (TMP21)は細胞傷害顆粒画分にも含まれることが報告されている。本研究では、細胞傷害顆粒等の分泌型リソソームの可視化を目的として、タンパク質のリソソームへの局在性を解析した。
【方法】ラット腎臓由来 normal rat kidney (NRK)細胞、ゴールデンハムスター腎臓由来 baby hamster kidney (BHK)-21 細胞、ヒト肺がん由来 A549 細胞を実験に用いた。EGFP タグを連結した LAMP-1、perforin、granzyme B、HM13、TMP21 をコードする発現ベクターを構築し、細胞にトランスフェクトした。LysoTracker® Red DND-99 でリソソームを染色し、共焦点顕微鏡を用いてタンパク質の細胞内局在を観察した。
【結果と考察】NRK 細胞では、LAMP-1-EGFP は細胞内に散在して局在し、LysoTracker® Red DND-99 との局在性が一致した。一方、BHK-21 細胞では、LAMP-1-EGFP は、LysoTracker® Red DND-99 との局在性が一致せず、比較的一箇所に集積している傾向が見られ、LAMP-1 は主にトランスゴルジ網に局在していることが示唆された。さらに、NRK 細胞と BHK-21 細胞において、内在性の LAMP-1 を染色したところ、両細胞間で LAMP-1 の細胞内局在の違いが見られ、それは LAMP-1-EGFP の細胞内局在と同様の傾向を示した。したがって、BHK-21 細胞における LAMP-1 の細胞内局在は EGFP タグの影響ではなく、BHK-21 細胞では LAMP-1 のリソソームへの局在化機構が正常に機能していないことが明らかになった。さらに、A549 細胞において、EGFP タグを連結した LAMP-1、perforin、granzyme B、HM13、TMP21 を発現させたところ、LAMP-1、perforin、granzyme B は LysoTracker® Red DND-99 と共局在を示したが、HM13 と TMP21 は LysoTracker® Red DND-99 と部分的な共局在を示した。以上の結果から、可溶性タンパク質である perforin や granzyme B は膜タンパク質である LAMP-1 と同様にリソソームを可視化するマーカータンパク質として利用できることが示された。

lysosome-associated membrane protein, perforin, granzyme B

発表責任者：片岡孝夫（takao.kataoka@kit.ac.jp）

講演番号：2A02p10
講演日時：3 月 18 日 16:25～ A 校舎 02 会場

# ヒト間葉系幹細胞株 UE7T-13 細胞において HNF4αおよび HNF1αの共発現は MTP の発現を誘導する

# Microsomal triglyceride transfer protein is induced by co-expression of HNF4αand HNF1α in a human mesenchymal stem cell line, UE7T-13

○佐々木 玲[1,2]、樋渡 一之[2]、熊谷 昌則[2]、畠 恵司[2]、小林 正之[1]([1]秋田県大院、[2]秋田総食研セ)
○Akira SASAKI[1,2], Kazuyuki HIWATASHI[2], Masanori KUMAGAI[2], Keishi HATA[2], Masayuki KOBAYASHI[1] ([1]Akita Pref. Univ., [2]ARIF)

【目的】中性脂肪（TG）やコレステロールなどの脂質は血中を循環するため，アポリポタンパク質やリン脂質と結合し，リポタンパク質を形成する。脂質代謝の中心的役割を担う肝細胞は，その形成過程においてリポタンパク質産生能を獲得すると考えられるが，その詳細は不明である。我々はこれまでに，リポタンパク質の精密な分析は，肝細胞の分化段階を判断する上で有用な分化マーカーになることを提案した[1)]。そこで本研究では，肝細胞の形成過程におけるリポタンパク質産生能の獲得機構を解明するため，ヒト間葉系幹細胞株 UE7T-13 細胞を用いて，肝細胞の分化に関与する肝細胞核因子（HNF）群が肝細胞への分化およびリポタンパク質産生能に与える影響について検討した。
【方法】UE7T-13 細胞において，HNF4α/HNF1α共強制発現細胞を樹立し，リアルタイム RT-PCR 法により，肝細胞分化マーカー遺伝子(*AFP, ALB*) の発現解析を行った。次に，オレイン酸（0.75 mM）添加培養を行い，細胞内および培養上清中の TG およびコレステロール量を定量した。さらに，リアルタイム RT-PCR 法およびウエスタンブロット法により，超低密度リポタンパク質の形成に必須な ApoB100 および MTP の発現解析を行った。
【結果および考察】HNF4α/HNF1α共強制発現細胞における *AFP* および *ALB* の mRNA 発現量は，コントロールと比較してそれぞれ 6.9 x $10^2$～1.0 x $10^3$ 倍，9.8～52.0 倍に大きく増加した。しかし，これらの発現量はヒト肝癌細胞株 HepG2 細胞の発現量には及ばなかった。HNF4α/HNF1α共強制発現細胞における TG およびコレステロールの細胞内含量は，コントロールと比較してそれぞれ有意に高く($p$<0.01)，HepG2 細胞と同程度だった。しかしながら，HNF4a/HNF1a 共強制発現細胞の培養上清から TG およびコレステロールはほとんど検出されなかった。このことから，HNF4α/HNF1α の共強制発現は細胞内への脂質の蓄積を促進するが，リポタンパク質の産生には至らないことが示唆された。また，HNF4α/HNF1α共強制発現細胞における *MTP* および *ApoB100* の mRNA 発現量は，コントロールと比較して，それぞれ 53.3～81.4 倍，63.6～310.8 倍に増加した。しかしながら，HNF4α/HNF1α共強制発現細胞において，MTP は検出されたものの，ApoB100 は検出されなかった。以上の結果から，HNF4α/HNF1αの共強制発現は，肝細胞への分化および MTP の発現を誘導できる一方，リポタンパク質産生能の獲得には，さらなる要因による ApoB100 の活性化が必要であると考えられる。

1) Sasaki A., et al. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* (2016)

MTP, HNF4α, HNF1α

発表責任者：佐々木　玲（asasaki@arif.pref.akita.jp）

講演番号：2A02p11
講演日時：3 月 18 日 16:50～ A 校舎 02 会場

# アミノ酸は細胞内カルシウム濃度上昇を介して mTORC1 経路を活性化する
# Amino acids activate mTORC1 through intracellular calcium rise

○高原 照直、中村 奈央、王 悦、渡邊 穂実、柴田 秀樹、牧 正敏（名大院生命農）
○Terunao TAKAHARA, Nao NAKAMURA, Yue WANG, Honomi WATANABE, Hideki SHIBATA, Masatoshi MAKI (Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

**［目的］**アミノ酸は細胞において必須の栄養素でありシグナル因子としても重要である。アミノ酸応答の主要なシグナル伝達経路として mechansitic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) 経路がある。mTORC1 はアミノ酸をシグナルとして活性化され、下流の p70 S6 kinase（S6K）などの基質をリン酸化することで、細胞成長や増殖を制御している。これまでの研究で、アミノ酸枯渇した細胞にアミノ酸溶液を与えると細胞内カルシウム濃度が上昇することが報告されている。しかしながら、その具体的な分子機構や mTORC1 経路への意義はよく分かっていない点が多い。そこで本研究では、アミノ酸による mTORC1 活性化機構における細胞内カルシウムの役割について検討した。

**［結果・考察］** カルシウムキレーターである EGTA の培地中への添加により培地中のカルシウム濃度を減少させると、アミノ酸依存的な細胞内カルシウム濃度上昇が消失し、mTORC1 の基質である S6K のリン酸化も低下した。このことからアミノ酸依存的に細胞外からのカルシウム流入が起こり、これが mTORC1 活性化に重要であることが分かった。このカルシウム流入に関わる因子の同定を目指し、複数のカルシウムチャネル阻害剤を用いて検討したところ、Amiloride の存在下でアミノ酸依存的な S6K のリン酸化が低下した。Amiloride の標的として上皮性ナトリウムチャネル(ENaC)やいくつかのカルシウムチャネルが知られている。ENaC 阻害剤である Triamterene では S6K のリン酸化を阻害しなかったことから、Amiloride 感受性のカルシウムチャネルがアミノ酸依存的な mTORC1 活性化に関わると考えられた。

次に、mTORC1 経路におけるカルシウムの作用機構を解析した。アミノ酸による mTORC1 活性化機構として、低分子量 GTPase である Rag により mTOR がリソソームへ移動した後、別の低分子量 GTPase である Rheb との結合により活性化されると考えられている。さらに恒常的活性化型 Rag や Rheb の過剰発現により、アミノ酸飢餓条件でも mTORC1 の活性が維持されることが報告されている。そこで Rag と Rheb の恒常的活性化型を過剰発現させた条件下で、細胞内カルシウムキレート剤 BAPTA-AM の影響を調べたところ、BAPTA-AM 処理により Rag 過剰発現による mTORC1 活性は低下したが、Rheb 過剰発現では維持されていた。このことからカルシウムは Rheb による制御の上流で作用すると考えられた。さらに、アミノ酸依存的な mTOR と Rheb の細胞内局在を調べたところ、EGTA 処理により両者の共局在が低下する可能性が示唆された。これらのことから、アミノ酸依存的なカルシウム上昇は、Rheb と mTOR との結合を制御している可能性が考えられた。

amino acids, calcium, mTOR

発表責任者：高原照直（takahara@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2A02p12
講演日時：3 月 18 日 17:05～ A 校舎 02 会場

運動及び栄養条件の変化による CXCL10 の発現変動
Exercise and nutrition-dependent CXCL10 regulation in skeletal muscle cells
○石内 友里、佐藤 整、川口 英夫、根建 拓（東洋大生命）
○Yuri ISHIUCHI, Hitoshi SATO, Hideo KAWAGUCHI, Taku NEDACHI (Toyo Univ.)

運動は、骨格筋での代謝を亢進させることや筋発達などの生理変化を引き起こすことが知られている。また、運動による生理変化は骨格筋のみならず脳神経系や免疫系など体全体でみられることも知られている。近年、運動によって骨格筋由来分泌タンパク質(マイオカイン)の分泌・発現が変動し、この運動依存的なマイオカインの発現変化が他の組織や臓器の生理変化を惹起している可能性が示唆されている。これまでに我々はマウス骨格筋由来 C2C12 細胞を用い、電気パルス刺激(Electrical pulse stimulation; EPS)による収縮によって分泌が制御されるマイオカインの網羅的同定を行い、新規運動抑制性マイオカインの一つとして、CXCL10 (Interferon gamma inducible protein 10; IP-10)を同定した。CXCL10 は血管新生の強力な阻害剤として働くことが報告されており、この運動依存的な CXCL10 制御は血管新生亢進に重要である可能性が考えられる。本研究は、骨格筋における運動や栄養条件の変化に応答した CXCL10 分泌及び遺伝子発現制御を細胞内シグナルの観点から明らかにすることを目的とした。

まず、C2C12 筋管細胞を用いて、EPS による擬似運動あるいはグルコース枯渇によって CXCL10 がどのように制御されるかを調べた。その結果、擬似運動は CXCL10 の遺伝子発現量及び分泌量を大きく減少させたが、グルコース枯渇は CXCL10 の遺伝子発現をむしろ促進することが分かった。次に、運動及びグルコース枯渇で共通して活性化する AMPK の役割を解析したところ、AMPK 活性化は C2C12 細胞における CXCL10 の遺伝子発現を促進することが分かった。さらに我々は、擬似運動によってのみ活性化するストレス応答性 MAPK である p38 の役割を解析したところ、この運動依存的な p38 活性化は CXCL10 の分泌量及遺伝子発現量を減少させることが示唆された。すなわち、骨格筋における運動は、AMPK 活性化を介した CXCL10 発現増強、および p38 活性化を介した発現抑制の二つの機構を稼働させ、総合的に CXCL10 の発現・分泌を調節していることが示唆された。一方、グルコース枯渇と AICAR による強制的な AMPK 活性化は CXCL10 制御に対してほぼ同様の影響を与えたことから、グルコース枯渇による CXCL10 制御は主に AMPK 活性化を介していることが考えられる。

骨格筋近傍の血管新生制御には VEGF をはじめとする様々な因子が関与していることが報告されているが、今回明らかになった収縮依存的な p38 活性化を介した CXCL10 の減少は、このような運動依存的な血管新生亢進を制御するメカニズムの一つである可能性が考えられる。

Exercise, Glucose, Skeletal muscle

講演番号：2A02p13
講演日時：3 月 18 日 17:20～ A 校舎 02 会場

# グリセルアルデヒド由来メイラード反応後期段階生成物と RAGE による相互作用の解析

# Analysis of interaction between advanced glycation end products derived from glyceraldehyde and RAGE.

○藤野 峻行[1]、村上 庸人[1]、三浦 彩[1]、吉橋 なおみ[1]、臼井 照幸[2]、渡辺 寛人[1]、早瀬 文孝[1]([1]明治大農、[2]女子栄養大)
○Takayuki FUJINO[1], Youto MURAKAMI[1], Aya MIURA[1], Naomi YOSHIHASHI[1], Teruyuki USUI[2], Hirohito WATANABE[1], Fumitaka HAYASE[1] ([1]Meiji Univ., [2]Kagawa Nutrition Univ.)

【目的】

メイラード反応とは、タンパク質などのアミノ化合物と、還元糖などのカルボニル化合物との間で起こる非酵素的褐変反応であり、Advanced glycation end products（AGEs）を生成する。メイラード反応によるタンパク質中のリジン残基、アルギニン残基の修飾は、タンパク質の機能低下や細胞毒性を引き起こす。グリセルアルデヒド（GLA）は代謝異常や糖の分解などで生成し、カルボニル化合物としてアミノ酸を修飾する。GLA 由来の主要な AGEs として GLAP や MGH1 が報告されている[ 1 ][ 2 ]。中でも GLAP は Receptor for AGEs（RAGE）に認識されることにより細胞毒性を示すことが明らかになっている[ 3 ]。本研究では、GLAP に類似したアナログ化合物を合成することで、RAGE との相互作用機構について解明することを目的とした。

【実験方法】

0.1 M の pyridine 構造を持つ化合物と 0.1 M の 6-bromohexanoic acid または 6-bromohexane を 10 ml の acetone に溶解後、3 時間 100℃で反応させた。その後、acetone を減圧下で除去し、Sep-pak C18 に供し非極性の化合物を除去した。濃縮後、HPLC により GLAP のアナログ化合物の単離・精製を行った。単離した化合物は LC-ESI-Q-TOF-MS、NMR にて構造を確認した。その後、PC12 細胞に 100 μM の合成した化合物を添加、72 時間後に細胞数を計測することで細胞毒性試験を行った。

【結果・考察】

Acetone 中での合成により GLAP に構造が類似した pyridinium 構造を持つアナログ化合物を複数種合成した。アナログ化合物の中でも hydroxypyridinium 構造を有する化合物の添加により細胞生存率が減少した。中でも 3-hydroxypyridinium 構造を持つ化合物において他のアナログよりも強い毒性が確認された。以上より、GLAP が示す細胞毒性には 3-hydroxypyridinium 構造が重要であり、RAGE との相互作用にこの構造が重要であることが示唆された。

[ 1 ] Usui, T., and Hayase, F.,：*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67 (4), 930-932, 2003
[ 2 ] Usui, T., M., Watanabe, H., and Hayase, F.,：*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70 (6), 1496-1498, 2006
[ 3 ] 長谷川俊樹、藤野峻行、臼井照幸、渡辺寛人、早瀬文孝　2015 年度日本農芸化学会　3F26a11

glycation, RAGE, hydroxypyridine

講演番号：2A02p14
講演日時：3 月 18 日 17:35～ A 校舎 02 会場

ケンフェロールとルテオリンによる薬物代謝酵素発現調節機構について
Effect of co-treatment with kaempferol and luteolin on expression of drug-metabolizing enzymes
○中井 里香、山下 陽子、芦田 均（神戸大農）
○Rika Nakai, Yoko Yamashita, Hitoshi Ashida (Kobe Univ.)

【目的】
化学発がんの発症やその増悪、あるいは化学発がんの抑制に深く関与する薬物代謝酵素の発現は、上流域でさまざまな制御を受けている。核内受容体の一つである aryl hydrocarbon receptor (AhR) は、cytchrome P450 1A1 (CYP1A1) などの第 I 相酵素を、転写因子 NF-E2 related factor 2 (Nrf2) は、NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) などの第 II 相酵素の発現を制御する。ルテオリンとケンフェロールは、AhR の活性化を抑制することが報告されているが、その下流の薬物代謝酵素の発現に及ぼす影響については十分に明らかにされていない。本研究では、AhR と Nrf2 を介した薬物代謝酵素発現に対するルテオリンとケンフェロールの共作用の影響、およびその作用機構の解明を目的とした。
【方法】
ヒト肝癌由来 HepG2 細胞に 3、10、ならびに 30 μM のルテオリンあるいはケンフェロールと、AhR の活性化剤である 1 nM の TCDD、あるいは Nrf2 の活性化剤である 30 μM の *tert*-butylhydroquinone (*t*-BHQ) を 24 時間共作用させ、第 I 相酵素である CYP1A1 と第 II 相酵素である NQO1、heme oxigenase 1 (HO-1)、aldo-keto reductase (AKR) 1B1 ならびに 1C1 のタンパク質発現量を解析した。また、HepG2 細胞に 10 μM のルテオリンあるいはケンフェロールを 0.5～4 時間単独あるいは共作用させ、細胞内へ取り込まれたルテオリンとケンフェロールの量を、HPLC を用いて検出した。
【結果】
ルテオリンとケンフェロールは、それぞれ単独で TCDD によって誘導された薬物代謝酵素の発現を濃度依存的に抑制することを確認した。ルテオリンとケンフェロールを共作用させた場合、薬物代謝第 I 相酵素の CYP1A1、ならびに第 II 相酵素の HO-1 において、単独で作用したときよりも強い抑制効果が見られた。さらにルテオリンとケンフェロールを共作用させた場合、作用後 0.5 時間ならびに 1 時間時の細胞内のケンフェロールの取り込み量が顕著に増加することが明らかになった。以上の結果から、ルテオリンとケンフェロールを同時に作用させると、ケンフェロールの細胞内への取り込み量が増加し、薬物代謝酵素の発現抑制効果がより強くなることが示唆された。

drug-metabolizing enzymes, Kaempferol, Luteolin

発表責任者：芦田　均（ashida@kobe-u.ac.jp）

講演番号：2A02p15
講演日時：3 月 18 日 17:50～ A 校舎 02 会場

デキサメタゾン誘導性筋タンパク分解抑制効果を有する食品成分の探索とその作用機構の解明
Search for food ingredients to prevent dexamethasone-induced muscle protein degradation and elucidation of its mechanism
○久保田 祐介、芦田 均 (神戸大農)
○Yusuke Kubota, Hitoshi Ashida (Kobe univ.)

【目的】筋重量が減少すると、歩行困難や寝たきりの状態となり、QOLの低下を招く。高齢化社会を迎えた日本において、これらの症状は重要社会問題となっており、日常的に摂取する食品成分による予防対策に注目が集まっている。筋重量は、筋肉細胞内のタンパク質の合成と分解のバランスによって制御されており、このバランスが崩れ、分解側に傾くことによって筋萎縮が生じる。そこで本研究では、ポリフェノールを対象にスクリーニングを行った。その結果、glabridinがタンパク分解を抑制することを見出したのでその分子機構の解明を試みた。
【方法】タンパク質合成の評価には、glabridinをC2C12細胞に作用させ、1.0 μCi L-[3,5-$^{3}$H]-tyrosineを培地に添加した。細胞内に取り込ませて、新たに合成したタンパク質の放射活性を測定した。一方、タンパク質分解の評価には、予め1.0 μCi L-[3,5-$^{3}$H]-tyrosineでラベルした細胞にデキサメタゾン（Dex）を作用させ、培地中に放出された放射活性をラベルされたタンパク質の見かけの分解量として測定した。また、効果が認められた食品成分に関しては、細胞内に残存したタンパク中の放射活性を測定し、真のタンパク質分解量を評価した。ユビキチンプロテアソーム経路に関わる因子の発現量やリン酸化レベルをウエスタンブロッティングにより評価した。glucocorticoid receptor（GR）の核内移行は蛍光免疫染色によって観察した。
【結果】ポリフェノール15種をスクリーニングした結果、タンパク質合成を促進する化合物は認められなかった。一方、Dex誘導性の筋タンパク質分解を抑制するポリフェノールとして、glabridin, 4-hydroxyderricin, ならびにxanthoangelolを見出した。これらについて真のタンパク質分解量を求めたところ、glabridinと4-hydroxyderricinにおいて、誘導されたタンパク質分解を有意に抑制した。これらの内glabridinに着目し、分子機構を検討したところ、Dexによって誘導されたp38、ならびにその下流因子であるFoxo3aの活性化を抑制していた。また、蛍光免疫染色により、コントロールにおいて細胞質に局在しているGRはDexの作用によって核に移行するが、glabridinの前処理によって核移行が抑制された。これらによって発現が制御されているMuRF-1とcbl-bの発現量を減少させることが明らかとなった。以上のことから、glabridinはFoxo3aとGRの二つの経路を介してユビキチンリガーゼの発現を抑制し、ユビキチンプロテアソーム経路を制御することで筋タンパク質の分解抑制効果を有することが明らかとなった。したがって、glabridinは筋萎縮予防に有効な食品成分の候補である。

Muscle protein degradation, Glabridin, Dexamethasone

講演番号：2A03a01
講演日時：3 月 18 日 09:20～ A 校舎 03 会場

# 社会的認知記憶課題を用いた新規性認識メカニズムの組織学的解析

# Analysis of memory circuits discriminating novel and familiar mice

○谷水 俊之[1]、喜田 聡[1,2] ([1]東京農大院・農・バイオ、[2]JST, CREST)
○Toshiyuki TANIMIZU[1], Satoshi KIDA[1,2] ([1]Dep. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture, [2]CREST, JST)

社会記憶（他者を覚える記憶）は社会生活を営む上で必要不可欠な記憶であり、社会行動を制御する基盤となっている。この障害は様々な精神疾患や発達障害の原因となっていると考えられている。マウスを用いた社会的認知記憶課題では、記憶能力を評価する成熟マウスに対して性的に未成熟な幼若マウスを提示して、幼若マウスに成熟マウスが接触した時間の長さを指標にして、社会記憶を評価する課題である。すなわち、初対面（トレーニング）の時よりも、二度目の対面（テスト）において接触時間が短くなれば幼若マウスのことを記憶していたと判断する。記憶は形成当初は不安定な状態にあり、新規遺伝子発現依存的な「固定化」のプロセスを経ることによって、安定な長期記憶として保持される。さらに、記憶は想起（思い出し）後に、プロテアソーム依存的なタンパク質分解を経ることで、形成当初と同様な不安定な状態に戻り、新規遺伝子発現依存的な「再固定化」のプロセスを経ることによって、再び安定な記憶として保存される。現在までに、我々はこの遺伝子発現変動を指標にして、社会記憶の固定化制御機構を解析し、海馬、扁桃体基底外側部、前帯状皮質並びに前頭前野で構成される神経ネットワークにより社会記憶固定化が行われることを示してきた。本研究では、マウスが対面したマウスを既知であるか、新規であるかを識別する「社会識別（他者の識別)」を制御するメカニズムを Cellular compartment analysis of temporal activity by fluorescence in situ hybridization (catFISH)法及び免疫蛍光染色法を用いて組織学的に解析した結果を報告する。既知と新規の幼若マウスを提示した場合に活性化される神経集団を Arc と Homer 1a (H1a) mRMA 発現を指標とした catFISH 法を用いて同定した結果、既知の幼若マウスを提示した場合には、海馬及び前頭前野では初めて幼若マウスを提示した時と同じニューロン集団が活性化された。一方、前帯状皮質および扁桃体領域では、既知及び新規に関わらず、ランダムなニューロン集団の活性化が観察され、海馬及び前頭前野が社会識別を担うことが示唆された。さらに、興味深いことに、免疫蛍光染色法を用いた解析の結果、海馬及び前頭前野では、既知のマウスを提示した場合にのみプロテオソーム依存的タンパク質分解の活性化が観察された。従って、タンパク質分解の活性化の有無により社会識別の状態を評価できることが示唆された。以上より、海馬及び前頭前野は社会識別の中心的な脳領野であり、これら領野において、プロテオソーム依存的タンパク質の活性化を通して、「既知あるいは新規のマウスに対面したのか」が脳内で情報処理されているメカニズムの存在が示唆された。

social memory, discrimination, mouse

講演番号：2A03a02
講演日時：3 月 18 日 09:35～ A 校舎 03 会場

# 恐怖記憶固定化に対するパルブアルブミン陽性ニューロンの役割

# Role of parvalbumin-positive neuron in consolidation of contextual fear memory

○矢部 穂乃佳[1]、石川 理絵[1]、喜田 聡[1,2] ([1]東京農大院・農・バイオ、[2]JST, CREST)
○Honoka YABE[1], Rie ISHIKAWA[1], Satoshi KIDA[1,2] ([1]Dept. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture, [2]CREST, JST)

記憶は形成当初は不安定な状態にあり、新規遺伝子発現依存的な「固定化」のプロセスを経ることによって、安定な長期記憶として保持される。現在までに、記憶固定化に対する興奮性ニューロンの役割の解明は進んでおり、興奮性ニューロンにおける転写因子 CREB の重要性が示されている。一方、抑制性ニューロンは、シナプス伝達として神経伝達物質 GABA を放出し、投射先のニューロン活性を抑制する。抑制性ニューロンのカルシウム結合パルブアルブミンタンパク質（PV）を発現するパルブアルブミン陽性ニューロン（PVN）は、抑制性ニューロンの一種であり、近年、扁桃体 PVN が恐怖記憶の獲得を制御することが示されている（Wolff et al., 2014)。しかし、このような例を除いては、記憶制御に対する抑制性ニューロンの役割の解明はほとんど進んでいない。そこで、本研究では、恐怖記憶固定化に対する抑制性ニューロンの役割の解明する一端として、恐怖記憶固定化に必要である CREB による遺伝子発現誘導を指標にして、恐怖条件付け文脈記憶固定化時の PVN の動態を組織学的に解析した。恐怖記憶固定化誘導のため、マウスを条件付けチャンバーに入れ、0.4mA、2 秒間の電気ショックを与えた（条件付け)。その 90 分または 3 時間後に灌流固定を行い、CREB 標的遺伝子である初期応答遺伝子 c-fos 及び PV の発現誘導を指標とした二重蛍光免疫染色により、前頭前野（PL、IL)、前帯状皮質（ACC)、扁桃体（LA、BLA)、海馬（CA1、CA2、CA3、DG）領域におけるそれぞれの陽性細胞数及び二重陽性細胞数をカウントした。一方、コントロール群として、電気ショックを与えなかった群と、処置を施さない群を設けた。その結果、前頭前野 PL 及び扁桃体 BLA 領域では、コントロール群に比較して、条件付け 90 分後に c-fos 及び PV 陽性細胞数が有意に多く観察され、特に PL 領域では二重陽性細胞数も有意に多く観察された。一方、海馬 CA2 及び CA3 領域では、コントロール群に比較して、条件付け 90 分後に c-fos 陽性細胞数が有意に多く観察され、PV 陽性細胞数はコントロール群と同程度であったものの、二重陽性細胞数は有意に多く観察された。以上の顕著な c-fos 及び PV 陽性細胞数並びに二重陽性細胞数の変化は条件付け 90 分後がピークであり、条件付け 3 時間後にはほとんどの領域において観察されなくなった。以上の結果から、恐怖記憶固定化時に PL 及び BLA 領域では PV の発現量自体が劇的に変動することが示唆され、特に、前頭前野 PL 及び海馬 CA2、CA3 領域では、興奮性ニューロンと同様に、恐怖記憶固定化時に PVN において新規遺伝子発現が誘導されることが示された。以上より、記憶固定化に対する PVN の重要性が示唆された。

parvalbumin, interneuron, fear memory

講演番号：2A03a03
講演日時：3 月 18 日 09:50～ A 校舎 03 会場

光遺伝学的手法を用いた想起後の恐怖記憶制御に対する海馬の役割の解析
Understanding roles of hippocampus in regulation of retrieved contextual fear memory using optogenetics
○長葭 大海[1]、福島 穂高[1,2]、喜田 聡[1,2]([1]東京農大・院・バイオ、[2]CREST,JST)
○Taikai NAGAYOSHI[1], Hotaka FUKUSHIMA[1,2], Satoshi KIDA[1,2] ([1]Dept. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture, [2]CREST,JST)

トラウマ記憶は心的外傷後ストレス障害（PTSD）の原因となり、現在、トラウマ記憶を人為的に制御することによる PTSD 治療方法の開発が試みられている。ヒトを含む動物に観察される恐怖記憶はトラウマ記憶の代表的モデルであり、特に、げっ歯類の恐怖条件付け文脈記憶課題は、世界的に用いられている恐怖記憶課題である。恐怖体験後に恐怖記憶は固定化のプロセスを経て、安定な記憶として保存されるが、恐怖記憶が想起（思い出）されると、想起後の記憶制御プロセス群が誘導される。我々の恐怖条件付け文脈記憶課題を用いた解析では、電気ショック（恐怖体験）を受けた箱に短時間（３分間）戻すと、恐怖記憶（恐怖反応）を維持あるいは増強する「再固定化」が誘導され、長時間（30 分間）戻すと、恐怖（電気ショック）が再び与えられないことを学習して恐怖記憶が減弱する「消去」誘導される。このように、恐怖記憶想起後には、想起する時間の長さに応じて、恐怖記憶を正あるいは負にと正反対に制御する再固定化と消去が誘導されるものの、再固定化と消去のどちらを誘導するのかを決定するメカニズムは未だ不明である。現在までの我々の解析では、再固定化誘導時には海馬において転写因子 CREB　依存性遺伝子発現が誘導されるのに対して、消去誘導時にはこの遺伝子発現が誘導されないこと、従って、再固定化と消去とでは海馬が対照的な生化学的変化を示し、想起時間が長くなると海馬が能動的に不活性化されることが示唆されている(Mamiya et al., 2009)。そこで、本研究では、海馬の活性状態により想起後の記憶が再固定化（記憶の維持・強化）されるのか、あるいは、消去されるのかを決定しているのではないかと考え、光遺伝学的手法を用いて、この仮説を検討した。前脳特異的にチャネルロドプシン 2（ChR2)またはアーチロドプシン T（ArchT)を発現するトランスジェニックマウスを用いて、恐怖条件付け 24 時間後に 10 または 30 分間電気ショックを受けたチャンバーにマウスを戻して恐怖記憶を想起させて（再エクスポージャー)、想起中に海馬を人為的に活性化あるいは不活性化させた影響を解析した。その結果、短時間（10 分間）の再エクスポージャー時に海馬を不活性化させると、その後に恐怖反応の減少が観察され、海馬不活性化が恐怖条件付け文脈記憶を減弱させることが示された。一方、長時間（30 分間）の再エクスポージャー時に海馬を活性化させると、消去の阻害が観察され、想起時の海馬不活性化を介して消去が誘導されることが示唆された。以上の結果から、恐怖記憶の想起時に、海馬の活性変動を介して、恐怖記憶が維持（再固定化）される、あるいは、消去されるかが決定されるメカニズムの存在が強く示唆された。

hippocampus, contextual fear memory, optogenetics

講演番号：2A03a04
講演日時：3 月 18 日 10:05～ A 校舎 03 会場

# SUMO 化を介したパーキンソン病関連転写因子 PARIS の活性制御

# SUMOylation-mediated regulation of PARIS transcriptional activity.

○西田 有、山田 芳司（三重大・先端科学研究支援センター）
○Tamotsu Nishida, Yoshiji Yamada (Mie Univ. Adv. Sci. Res. Ctr.)

KRAB-Zn フィンガー転写抑制因子 PARIS/ZNF746 は家族性パーキンソン病の原因遺伝子 parkin の産物であるユビキチンリガーゼ Parkin の新たな基質として同定された。PARIS はヒトのパーキンソン病患者の脳に蓄積し、転写コアクチベーターPGC-1α とその標的遺伝子の発現を抑制することによりドーパミン神経の変性に深く関与していることが示されている。しかし、PARIS の転写抑制の制御機構はほとんど明らかにされていない。我々は PARIS が SUMO 化されることを見出し、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞において PARIS の SUMO 化は PGC-1α 遺伝子プロモーターにおける転写抑制に働くこと、さらに SUMO E3 リガーゼ PIASy は特異的に PARIS の SUMO 化を促進し、転写活性を制御することを明らかにした(Nishida et al. BBRC 2016)。 今回は PARIS の SUMO 化とアセチル化、ユビキチン化の関係を解析した。PARIS は SUMO 化部位のリジン残基依存的にアセチル化された。ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤 trichostatin A(TSA)の添加により PARIS の PGC-1α 遺伝子プロモーターにおける転写活性抑制は顕著に脱抑制されたが、PIASy を介した転写抑制は TSA により脱抑制されなかった。プロテアソーム阻害剤 MG132 の添加により PARIS の SUMO 化、特に SUMO2/3 化は顕著に亢進し、さらにユビキチン化の亢進が認められた。一方、PIASy を介した PARIS の SUMO 化の亢進はユビキチン化を抑制した。
以上の結果から PARIS の転写活性は SUMO 化、アセチル化、ユビキチン化などの翻訳後修飾や PIASy などの転写コファクターを介して複雑に制御されていることが示唆された。

Sumo, Paris, Parkinson's disease

発表責任者：西田　有（nishida@gene.mie-u.ac.jp）

講演番号：2A03a05
講演日時：3 月 18 日 10:20～ A 校舎 03 会場

# 急性期の筋萎縮過程における遺伝子発現変動解析

# Analysis of differential gene expression in acute skeletal muscle (SKM) atrophy

○原田 哲仁[1]、岩崎 健[1]、横田 和也[2]、岡田 誠司[2]、大川 恭行[1] ([1]九大生医、[2]九大医)
○ Akihito HARADA[1], Takeshi IWASAKI[1], Kazuya YOKOTA[2], Seiji OKADA[2], Yasuyuki OHKAWA[1] ([1]Kyushu Univ. MIB, [2]Kyushu Univ. Med.)

骨格筋の筋萎縮は、筋量の変化のみならず筋線維そのものが変化していく大規模な遺伝子発現変動に基づく変化である。これまでの解析から、筋委縮過程における主要なシグナル経路が明らかとなっているが、広範な遺伝子発現変動が生じる機序については不明な点が多い。そこで、我々は、脊髄損傷により筋萎縮を誘導したマウスをモデルとして、筋萎縮過程における遺伝子の発現変動を網羅的に解析した。脊髄損傷前、損傷後（筋萎縮誘導後）1，3，7 日目の下腿三頭筋を用いたトランスクリプトーム解析により、筋萎縮誘導前後で転写量が変化している遺伝子を抽出した。その結果、21,839 遺伝子中 950 遺伝子に有意な変動を認め、筋萎縮誘導後 1 日目において発現変動遺伝子数が最多であった。また、筋量の減少率を調べるために CT 測定を行ったところ、下腿三頭筋の断面積は筋萎縮誘導後 1 日目に急速に減少し、その後 7 日目まで徐々に縮小傾向が続く 2 段階の萎縮が起こっていた。このことから、脊髄損傷直後に遺伝子発現レベルから急速に筋萎縮が進行する段階（急性期）と、徐々に萎縮が進行する段階（慢性期）が存在することが明らかとなった。この急性期における変化は、既知の遺伝子発現制御経路で支配されるより広範な遺伝子発現変化が生じており、未知の制御機構の存在が示唆された。本発表では、筋萎縮における急性期の遺伝子発現制御機構の解析結果について議論したい。

transcriptomics, muscle atrophy

講演番号：2A03a06
講演日時：3 月 18 日 10:45～ A 校舎 03 会場

# 遺伝性早老症ウェルナー症候群患者細胞は WRN タンパク質欠損に起因する細胞老化を呈する

# Fibroblasts derived from patients of Werner syndrome exhibit cellular senescence associated with WRN deficiency

○澁谷 修一[1,2]、飯塚 絹江[1]、横手 幸太郎[1]、清水 孝彦[1]（[1]千葉大院医、[2]日本学術振興会特別研究院 DC1）
○Shuichi Shibuya[1,2], Kinue Iizuka[1], Koutaro Yokote[1], Takahiko Shimizu[1]（[1]Chiba Univ. Grad. Sch. of Med., [2]J S P S Research Fellow DC1）

RecQ 型 DNA ヘリケース *WRN* は 2 重らせん構造の結合を緩めて 1 本鎖にし、DNA の修復や複製、組換え、転写を司る。*WRN* 変異は染色体の不安定性をもたらすことが知られ、ヒトでは遺伝性早老症ウェルナー症候群(Werner syndrome, WS)を生じる。WS は 20 歳代から白内障、毛髪変化、筋萎縮、皮膚の萎縮や潰瘍など全身で様々な老化様の病態を併発し、50 歳代で死に至ることが多い。幼少期から発症する他の早老症と異なり、WS は成人以降に発症する最も生理的老化に近い早老症であり、発症原因および治療法の研究は老化研究の基礎ともなり得る。本研究では WS の老化様病態の発症原因を明らかにするため、WS 患者由来線維芽細胞の細胞老化様表現型を解析した。

正常ヒトおよび複数種の WS 患者由来線維芽細胞を培養し、細胞増殖、細胞老化マーカー、細胞内活性酸素、および老化関連遺伝子発現を調べた。WS 患者細胞の WRN タンパク質発現を調べたところ、正常細胞では WRN タンパク質発現が確認できたが、いずれの WS 患者細胞も WRN タンパク質が欠失していた。WS 細胞は正常細胞と比較して有意に細胞増殖が減少し、継代初期に細胞老化マーカー SA-β-Gal 陽性細胞が増加するなど、細胞老化を呈していた。また正常細胞と比較して WS 患者由来線維芽細胞では高い細胞内活性酸素蓄積が見られ、酸化ダメージ増加が示唆された。WS 患者由来細胞では senescence-associated secretory phenotype の一種である *IL-6* 遺伝子発現も増加していた。さらに、WS 細胞では核膜タンパク質 LAP2β や Histone H3-Lys9 特異的なメチル基転移酵素 SUV39H1 発現も減少していた。

以上の結果から、WS 患者由来線維芽細胞は細胞老化を呈し、WS の老化様病態発症における核構造異常やエピゲノム変化の寄与が示唆された。

senescence, progeroid, helicase

講演番号：2A03a07
講演日時：3 月 18 日 11:00～ A 校舎 03 会場

乳がん細胞におけるクロモドメインタンパク質 CBX2 の機能解明と細胞系を用いた CBX2 阻害剤スクリーニング
Functional Analysis of Chromodomain Protein CBX2 in Breast Cancer Cells and Cell-based Screening for CBX2 Inhibitors

○横山 翔[1,2]、伊藤 昭博[1,3]、波多野 稔子[1]、松岡 聖二[4]、KUMAR Ashutosh[5]、ZHANG Kam[5]、浜本 牧子[2]、吉田 稔[1,3,4] ([1]理研・化学遺伝、[2]明治大院・農・生命科学、[3]理研・環境資源・ケミカルゲノミクス、[4]理研・環境資源・創薬シード、[5]理研・ライフサイエンス・構造バイオ)
○Sho YOKOYAMA[1,2], Akihiro ITO[1,3], Naruko HATANO[1], Seiji MATSUOKA[4], Ashutosh KUMAR[5], Kam ZHANG[5], Makiko HAMAMOTO[2], Minoru YOSHIDA[1,3,4] ([1]Chem. Genet. RIKEN, [2]Grad. Sch. Agri. Meiji Univ., [3]Chem. Genomics RIKEN CSRS, [4]Seed Cpds Explor. Unit Drug Discov. RIKEN CSRS, [5]Struct. Bioinform. RIKEN CLST)

ヒストン H3 の 27 番目のリジンのトリメチル化（H3K27me3）は転写抑制のエピジェネティックマークとして働く。この修飾を担うヒストンメチル化酵素 EZH2 は細胞のがん化との関連性が示唆されるが、H3K27me3 に直接結合して転写抑制を仲介するクロモドメインタンパク質 CBX2 のがん細胞での役割はほとんど不明である。そこで本研究では、EZH2 が高発現しているヒト乳がん MDA-MB-231 細胞に着目し、細胞増殖における CBX2 の重要性の解明を目的とした。
今回、細胞内 ATP 量を指標にして、CBX2 のノックダウンにより MDA-MB-231 細胞の増殖が顕著に抑制することを見出した。一方、正常繊維芽 TIG3 細胞ではそのような増殖抑制は観察されなかった。DNA マイクロアレイおよび定量的 PCR 解析によって CBX2 ノックダウンにより発現が変動する遺伝子を検討したところ、MDA-MB-231 細胞においてアポトーシスの促進因子である BIK、PUMA の発現上昇を見出した。また、CBX2 のノックダウン依存的にアポトーシスの指標である Cleaved PARP が検出された。一方、TIG3 細胞では BIK、PUMA の発現に変化はなかった。以上の結果から、CBX2 は BIK、PUMA の遺伝子発現を抑制することによりアポトーシスを回避し、ヒト乳がん細胞である MDA-MB-231 細胞の生存に寄与することが示唆され、CBX2 は乳がん治療の新しい分子標的になることを示唆する結果を得た。
そこで CBX2 阻害剤取得を目的として、生物発光共鳴エネルギー移動（BRET）を用いたハイスループットな化合物スクリーニングが可能な、CBX2 のクロモドメインと H3K27me3 の結合活性を測定出来る細胞ベースのアッセイ系の構築を行った。CBX2 の X 線結晶構造情報を基に *in silico* スクリーニングを行い、CBX2 のクロモドメインに結合すると予測された化合物を化合物データベースから選抜した。得られた化合物について構築した BRET アッセイ系を用いて評価したところ、細胞内で CBX2 クロモドメインと H3K27me3 の結合を阻害する化合物を複数見出した。表面プラズモン共鳴法を用いてヒット化合物は CBX2 のクロモドメインに直接結合すること確認した。本発表では、乳がん細胞における CBX2 の機能に加えて、CBX2 と H3K27me3 の結合を阻害する低分子化合物について報告する。

CBX2, Epigenetics, Methylation

講演番号：2A03a08
講演日時：3 月 18 日 11:15～ A 校舎 03 会場

内因性 SIRT2 阻害剤としての *N*-アシルセロトニンの発見
Discovery of *N*-acylserotonins as endogenous SIRT2 inhibitors
○坂本 和貴[1,2]、伊藤 昭博[1,3]、工藤 紀雄[4]、芹澤 茉里子[1]、中田 明子[4]、吉田 稔[1,2,3,4] ([1]理研・化学遺伝、[2]埼玉大院・理工、[3]理研・環境資源・ケミカルゲノミクス、[4]理研・環境資源・創薬シード)
○Kazuki SAKAMOTO[1,2], Akihiro ITO[1,3], Norio KUDO[4], Mariko SERIZAWA[1], Akiko NAKATA[4], Minoru YOSHIDA[1,2,3,4] ([1]Chem. Genet., RIKEN, [2]Grad. Sch. Sci. Eng., Saitama Univ., [3]Chem. Genomics, RIKEN CSRS, [4]Seed Cpds Explorat. Unit Drug Discov., RIKEN CSRS)

リジン脱アセチル化酵素である sirtuin は、様々な基質を脱アセチル化することで、栄養や環境刺激に対する様々な生物学的応答を制御する。ヒトでは SIRT1～7 の 7 種類のアイソフォームが存在するが、その中でも SIRT2 は主に細胞質に局在し、細胞周期、DNA 複製ストレス、エネルギー代謝など様々な生理作用に関与していることが知られている。Sirtuin による脱アセチル化反応には NAD を必要とすることから、その酵素活性は細胞内の NAD/NADH 比に応答して制御されていると考えられているが、内因性の阻害物質の存在は不明である。最近、SIRT2 を含む複数の sirtuin アイソフォームが脱長鎖アシル化酵素活性を有することが報告された。実際我々は、SIRT2 とミリストイル化リジンペプチド複合体の X 線共結晶構造を解くことに成功し、SIRT2 の基質結合部位の奥に長鎖アシル鎖が結合可能な疎水的空間が存在することを見出した。この結晶構造情報から脂肪酸代謝物が SIRT2 に対して阻害活性を有するのではないかと考え、200 種類以上の脂肪酸代謝物の SIRT2 阻害活性を検討したところ、痛み受容体であるバニロイド受容体のリガンドである *N*-アシルセロトニンが SIRT2 の脱アセチル化酵素活性を阻害することを見出した。

*N*-アシルセロトニンは、SIRT1 および SIRT3 の酵素活性には影響せず、SIRT2 の脱アセチル化酵素活性を選択的に阻害した。*N*-アシルセロトニンが細胞内で SIRT2 の活性を阻害出来るかどうか、アクチン結合タンパク質 cortactin および翻訳に関わる eukaryotic translation initiation factor 5A（eIF5A）のアセチル化レベルを指標に検討した。我々は、cortactin および eIF5A の脱アセチル化酵素として SIRT2 および HDAC6 を見出し、両酵素の同時阻害がアセチル化の増大に必要であることを報告している。そこで、HDAC6 の活性を阻害する trichostatin A（TSA）存在下で *N*-アシルセロトニンを添加したところ、濃度依存的に cortactin および eIF5A のアセチル化が増加した。以上の結果から、*N*-アシルセロトニンは内因性の SIRT2 阻害物質であることが示唆された。

TSA 単独処理で cortactin あるいは eIF5A のアセチル化レベルが増加する細胞は、SIRT2 を阻害する *N*-アシルセロトニンを恒常的に生産している可能性が高いと考えがん細胞のスクリーニングを行なった。その結果、34 種類のがん細胞のうち、卵巣がんおよび大腸がん由来の 2 種類の細胞株で、TSA 単独処理で cortactin のアセチル化レベルが顕著に増加することを見出した。現在、これら細胞株をモデル細胞として用いて、内因性の *N*-アシルセロトニンによる SIRT2 阻害機構の解析を進めている。

*N*-acylserotonins, Sirtuin, Metabolite

講演番号：2A03a09
講演日時：3 月 18 日 11:30～ A 校舎 03 会場

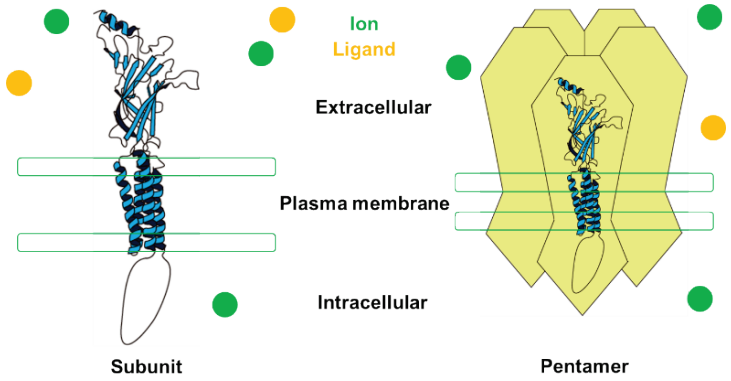
# カイコガ pH 感受性塩素チャネルの超多様化により生じる薬理学的特性の変化

# Changes of pharmacological characteristics by super diversification of pH-sensitive chloride channel in *Bombyx mori*

○奥原 大樹、伊原 誠、松田 一彦（近畿大・農）
○Daiki Okuhara, Makoto Ihara, Kazuhiko Matsuda (Fac. of Agri., Kindai Univ.)

【目的】

昆虫の神経系には脊椎動物では見られない神経受容体が多数発現している。例えばシステインループをもつリガンド作動性塩素チャネルではヒスタミン作動性塩素チャネルや pH 感受性塩素チャネル（pHCl）がその例であり、昆虫に対する選択毒性の高い殺虫剤を開発する上で重要と考えられる。その中でも pHCl は、中枢で発現しているにもかかわらず、内在性のリガンドが同定されておらず、その生理学的機能は謎に包まれている。本研究では、カイコガ pHCl（下図）について、一つの遺伝子から生じるスプライスバリアントがこれまでに報告したもの以上に存在することを明らかにし、最も多く発現しているバリアントについて電気生理学手法により機能解析を行ったので報告する。




【方法と結果】

P-50 系統の 5 齢幼虫を用いて、脳、胸部第 3 神経節、腸から RNA を抽出し、逆転写後、PCR によって pHCl の有無を調べた。pHCl は各部位で広く発現していた。シーケンシングによって新たに 51 種類のバリアントの存在が明らかになった。さらに、その配列を解析することで、非常に複雑なスプライシングによってこれらのバリアントが生じることがわかった。カイコガ体内で最も多く発現していた BmpHCl_C バリアントをアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、その特性を電気生理学的手法の一種である膜電位固定法を用いて調べた結果、これまでに報告された BmpHCl_A バリアントの場合とは異なり、pH に関わらずイベルメクチンが活性化作用を示した。これは、２つのバリアント間におけるアミノ酸配列の違いによって生じるものであり、これについてもあわせて紹介する。

pH-sensitive chloride channel, splice variant, ivermectin

講演番号：2A03a10
講演日時：3 月 18 日 11:45～ A 校舎 03 会場

# ニワトリ組織におけるキチナーゼ遺伝子発現レベルとその酵素学的機能の解析

# Gene expression and enzyme functional analysis of chicken acidic chitinase

○田畑 絵理、樫村 昭徳、大野 美紗、坂口 政吉、小山 文隆（工学院大工）
○ Eri TABATA, Akinori KASHIMURA, Misa OHNO, Masayoshi SAKAGUCHI, Fumitaka OYAMA (Kogakuin Univ.)

キチンは N-アセチル-D-グルコサミンが β-1, 4 結合した多糖で，エビ，カニ，昆虫など多くの生物に存在している。その分解酵素であるキチナーゼは，キチンを合成しない生物を含む広範囲の生物種で発現している。その一つに酸性キチナーゼ (Acidic Chitinase, Chia) がある。Chia は，活性のあるキチナーゼとして，マウスの胃と肺で高いレベルで発現し，喘息，アレルギーに関わることが示されている。しかし，ほ乳類以外の動物における Chia の発現レベル，機能に関する研究は進んでいない。本研究では，脊椎動物の代表モデル動物として，ニワトリにおける Chia の発現レベルと酵素学的機能の解析を行った。ニワトリの主要組織由来の各 cDNA と，Chia 遺伝子に相補的なプライマーを用いた定量 PCR を行ったところ，Chia mRNA は，胃で最も高く発現し，次いで脾臓で高い発現量を示した。次に，ニワトリの胃組織における Chia mRNA の発現レベルを，ハウスキーピング遺伝子である glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) と，そして，二種類の主要な胃粘膜タンパク質（Pepsinogen A と H+/K+-ATPase）との遺伝子発現比較解析を行った。その結果， Chia mRNA は，胃粘膜の主要タンパク質である pepsinogen A より低いレベルであったが，GAPDH と H+/K+-ATPase より著しく高く発現していた。これらのことから，Chia はニワトリの胃において，主要な転写産物であることが分かった。次に，ニワトリの胃における Chia の酵素活性を 4-nitrophenyl N,N’-diacetyl-β-D-chitobioside を基質とし，ニワトリの胃から調製した可溶性タンパク質を使って調べた。その結果，Chia は pH 2.0 に活性の至適を示し，pH 3.0~7.0 でも低いが，活性が認められた。このことから，ニワトリ Chia の活性は，強酸性で高いことが分かった。以上の結果は，ニワトリの胃で Chia が機能している可能性があることを示した。

Chitinase, Gene expression, Chicken

講演番号：2A03p01
講演日時：3 月 18 日 14:00～ A 校舎 03 会場

# CHERP の選択的 mRNA スプライシング制御機構解析
# The mechanism of mRNA splicing controlled by CHERP

○山中 靖貴、増田 誠司（京大院生命科学）
○Yasutaka YAMANAKA, Seiji MASUDA (Kyoto Univ.)

【背景・目的】

真核生物において、選択的 mRNA スプライシングはゲノムにコードされる遺伝子の数を超えた膨大な数のタンパク質を発現させる上で必須のメカニズムである。しかしながら、そのメカニズムは未解明な部分が多い。選択的スプライシングが崩壊・破綻すると癌や筋萎縮性側索硬化症等の重篤な RNA 病の原因となる。従って、mRNA 選択的スプライシングの分子メカニズムを解明することは、分子生物学や細胞生物学的知見のみならず、癌や難治性疾患の治療法開発や創薬の基盤にもなると考えられる。

CHERP は、小胞体内の $Ca^{2+}$代謝に関係する因子として報告されたが、核での機能を示唆する報告もあり、その生理機能はよくわかっていない。本研究において、CHERP の選択的 mRNA スプライシングにおける制御機構の解析を試みた。

【方法】

CHERP をノックダウンし mRNA の核での蓄積が観察されるかを蛍光顕微鏡で確認した。また、CHERP がどのようなタンパク質と相互作用しているかを免疫沈降法と質量分析法から同定した。次に CHERP の mRNA スプライシングにおける標的遺伝子あるいはエキソンについてエキソンアレイを用いて網羅的な解析を行った。そこで候補となった遺伝子等について RT-PCR による検証を行った。

【結果と考察】

CHERP をノックダウンすると mRNA の核での蓄積が観察された。また、CHERP がイントロンの 3’アクセプターに結合する U2 snRNP と強く相互作用していることを免疫沈降法と質量分析法から見いだした。これらの観察から CHERP は選択的 mRNA スプライシングを制御していると考えた。そこで、CHERP が関与する mRNA スプライシングについてエキソンアレイを用いて網羅的な解析ならびに RT-PCR による検証を計画した。まず調製した RNA サンプルについて、すでに報告されている IP3R1 の選択的スプライシングについて解析したところ、CHERP ノックダウンでは神経細胞で特異的に発現するアイソフォームが顕著に増加していることを確認した。次にエキソンアレイ解析を実施した結果、主に細胞骨格・細胞接着、細胞周期やアポトーシス関連因子を標的としていることを示す結果を得た。加えて癌関連遺伝子や筋萎縮側索硬化症への関与を示すデータを得た。以上の結果から、CHERP が新たな選択的スプライシングの分子機構を提示する能力を有し、また、癌や神経系疾患にとどまらず広範な遺伝子の選択的スプライシングを制御していると考えられる。

RNA, splicing

講演番号：2A03p02
講演日時：3 月 18 日 14:15～ A 校舎 03 会場

# 細胞周期制御に関与する長鎖ノンコーディング RNA の機能解析

# The regulation of cell cycle by long noncoding RNAs

○神武 洋二郎、苗村 円佳、井上 恭敏、岡本 春奈、田原 圭一郎（近大産理工）
○Yojiro Kotake, Madoka Naemura, Yasutoshi Inoue, Haruna Okamoto, Keiichiro Tahara (Kindai Univ.)

近年、RNA シーケンスやタイリングアレイ解析により、ヒトにおいて、長鎖ノンコーディング RNA（long noncoding RNA: lncRNA）は 1 万 4 千個以上存在することが分かった。lncRNA は、転写制御、翻訳制御、タンパク質輸送および核内構造体形成など、多種多様な作用機構を持つことが明らかとなった。また lncRNA は、分化、増殖、細胞死といった細胞運命決定において、重要な役割を担っていることが明らかとなりつつある。最近我々は、がん化シグナル（H-Ras$^{G12V}$過剰発現）によって複数の lncRNA の発現量が変動することを見出した。その中の 2 つの lncRNA、*ANRIL* と *PANDA* は、RB/p53 経路の制御に関与することが分かってきた。

*ANRIL* は、*INK4* 遺伝子座に存在し、近隣に存在する CDK インヒビター*p15/p16* 遺伝子とは逆向きに転写される。p15/p16 は、サイクリン D-CDK4/6 の活性を阻害することにより、RB 経路を正に制御する因子である。*ANRIL* をノックダウンした細胞は、*p15/p16* の転写が活性化し、早期細胞老化の表現型を示した。また *ANRIL* をノックダウンすると、*INK4* 遺伝子座上のポリコーム複合体結合量が減少することが分かった。さらに RNA immunoprecipitation assay の結果、*ANRIL* がポリコーム複合体構成因子 SUZ12 と結合していることが分かった。これらの結果から、*ANRIL* は、ポリコーム複合体と結合し、*INK4* 遺伝子座へのポリコーム複合体リクルートメントを促進することにより、*p15/p16* の転写を抑制し、RB 経路を負に制御する機能を持つことが考えられた。

一方、H-Ras$^{G12V}$過剰発現によって発現量が増加する *PANDA* は、CDK インヒビター*p21* の上流に存在する。*PANDA* をノックダウンした細胞では、p53 タンパク質のプロテアソーム依存的分解が促進し、半減期が短くなることが分かった。この結果から、*PANDA* は p53 タンパク質を安定化させる機能があることが示唆された。本発表では、RB/p53 経路の制御に関与する lncRNA、*ANRIL* と *PANDA* の機能とその作用機序を中心に、最近得られた知見を伴わせて紹介したい。

long noncoding RNA, cell cycle, RB

講演番号：2A03p03
講演日時：3 月 18 日 14:30～ A 校舎 03 会場

# 関節リウマチのモデル滑膜繊維芽細胞由来のエクソソームマイクロ RNA の解析

# Analysis of exosomal microRNAs derived from rheumatoid arthritis synovial fibroblasts

○高村 陽介[1]、里村 淳[1,2]、青木 航[1,3]、芝崎 誠司[4]、植田 充美[1,3]([1]京大農、[2]日本学術振興会特別研究員(DC1)、[3]京都バイオ計測センター、[4]兵庫医療大薬)
○Yosuke TAKAMURA[1], Atsushi SATOMURA[1,2], Wataru AOKI[1,3], Seiji SHIBASAKI[4], Mitsuyoshi UEDA[1,3] ([1]Kyoto Univ., [2]JSPS, [3]KIST-BIC, [4]Hyogo Univ. of Health Sci.)

「背景と目的」

関節リウマチは、関節内の滑膜組織で慢性的炎症が起こり、進行性の関節破壊に至る自己免疫疾患の一つであり、高齢化社会で患者数の非常に多い疾患である[1]。関節破壊のメカニズムとして、関節内でのサイトカインを介した、異常な細胞間コミュニケーションが関与することが知られているが、分子レベルでの詳細な機構については未解明の部分が残る。我々はこのメカニズムについて、細胞間コミュニケーションの観点から、エクソソームが関与していることを予測した。そこで、エクソソームに含まれているマイクロ RNA が、細胞から細胞へ運搬されることが、関節破壊のメカニズムに寄与するという仮説を立て、関節リウマチにおける滑膜線維芽細胞由来のエクソソームの単離と、そのマイクロ RNA の解析を行った。

「方法・結果」

関節リウマチ患者の滑膜線維芽細胞から樹立された培養細胞株 MH7A を実験に用いた。リウマチの発症状態を模して、生体内におけるのと同じ炎症刺激の有無での条件下、分泌されたエクソソームを単離した。そのマイクロ RNA プロファイルを次世代シーケンサーによって作成して、その結果を比較解析したところ、いくつかのマイクロ RNA が炎症刺激に応じて発現が大きく誘導されていることがわかった。これらのマイクロ RNA は、そのターゲット遺伝子の解析から、関節破壊のメカニズムに関与すると考えられたので、まとめて報告する[2]。

[1] S. Shibasaki *et al.* (2016) *FEBS Open Bio*, 6, 418-424
[2] Y. Takamura *et al.* submitted

Rheumatoid arthritis, Exosome, MicroRNA

講演番号：2A03p04
講演日時：3 月 18 日 14:45～ A 校舎 03 会場

# 遺伝学的相補実験系を用いたヒストンバリアント H2A.Z の機能解析

# Functional analysis of histone variant H2A.Z using genetic complementation of gene knockout cells

○成宮 巧[1]、日下部 将之[2]、堀越 直樹[3]、奥 裕之[2]、高橋 大輔[2]、胡桃坂 仁志[3]、原田 昌彦[2]([1]東北大学農学部、[2]東北大学大学院農学研究科、[3]早稲田大学・院・先進理　工/理工研/構造創薬研)
○TAKUMI NARIMIYA[1], MASAYUKI KUSAKABE[2], NAOKI HORIKOSI[3], HIROYUKI OKU[2], DAISUKE TAKAHASI[2], HITOSI KURUMIZAKA[3], MASAHIKO HARATA[2] ([1]Tohoku Univ, [2]Grad. Sch.,Tohoku Univ, [3]Grad.Sch.,Waseda Univ)

[背景]　真核生物において、ゲノム DNA はヒストンと結合してクロマチン構造を形成しており、クロマチン構造が動的に変換されることで転写制御や DNA 損傷修復など様々なゲノム機能が制御される。近年、クロマチン構造変換因子として、ヒストンバリアントが注目されている。ヒストンバリアントはコアヒストンと入れ替わることによってヌクレオソーム中に導入され、特異的なヌクレオソーム構造の形成を介してクロマチン構造を変換すると考えられている。H2A.Z はコアヒストン H2A のバリアンであり、そのアイソフォーム H2A.Z-1 を含むヌクレオソームは、通常よりも不安定なヌクレオソームを形成することが示されている [1)]。この性質が転写活性化や染色体分配といった様々なゲノム機能制御に寄与することが想定されているが、その詳細な解析はこれまでに行なわれていない。これまでの構造生物学的解析によって、H2A と比較して H2A.Z では、L1 ループとよばれる機能領域に構造上大きな違いがあることが見出されていた。そこで、H2A.Z-1 の L1 ループ領域に変異を導入した変異体を用いて、H2A.Z を含むヌクレオソームの不安定性が、ゲノム機能制御にどのように関与するかについて解析を行なった。
[結果と考察] H2A.Z の変異体の中から、ヌクレオソームを不安定化させる性質を喪失した H2A.Z-L1 mutant を見出した。本研究室はこれまでに、ニワトリの B リンパ球由来細胞 DT-40 細胞を用いて、H2A.Z 破壊 (H2A.Z KO)細胞を樹立し、さらに H2A.Z KO 細胞中で外来性 H2A.Z を安定発現させることで H2A.Z 破壊の表現型が相補可能であることを確認している [2)]。H2A.Z KO 細胞に野生型 H2A.Z および H2A.Z-L1 mutant 遺伝子を導入して安定発現株(KO/H2A.Z および KO/H2A.Z-L1 mutant)を樹立し、これらの表現型を比較することにより、H2A.Z を含む不安定なヌクレオソームがゲノム機能制御において果たす役割を解析した。まず、細胞増殖を解析した結果、両細胞株は同程度の細胞増殖を示すことが分かった。一方、H2A.Z によって転写誘導が制御されている *EGR1* 遺伝子に着目して定量 PCR 解析を行った結果、KO/H2A.Z-L1 mutant では *EGR1* 転写の誘導が検出されなかった。これらの結果から、H2A.Z を含む不安定なヌクレオソームの特性は、染色体分配においては必須ではない一方で、転写活性化においては重要な寄与をすることが示唆された。

1) Horikoshi et al., Open Biol 2016
2) Kusakebe et al., Genes Cells 2016

Epigenetics, Histone variant, transcriptional regulation

講演番号：2A03p05
講演日時：3 月 18 日 15:00～ A 校舎 03 会場

# ヒストンバリアント H2A.Z の分子進化学的保存性の解析

# Analyses of molecular evolution in the histone variant H2A.Z

○北川 紗帆[1]、日下部 将之[2]、奥 裕之[2]、高橋 大輔[2]、成宮 巧[1]、中林 悠[3]、関 政幸[3]、原田 昌彦[1,2] ([1]東北大農、[2]東北大院農、[3]東北医科薬科大薬)
○Saho KITAGAWA[1], Masayuki KUSAKABE[2], Hiroyuki OKU[2], Daisuke TAKAHASHI[2], Takumi NARIMIYA[1], Yu NAKABAYASHI[3], Masayuki SEKI[3], Masahiko HARATA[1,2] ([1]Tohoku Univ., [2]Grad. Sch., Tohoku Univ., [3]Tohoku Medical and Pharmaceutical Univ.)

真核生物において、ゲノム DNA はヒストンと結合することでクロマチン構造を形成し、細胞核内に効率よく収納されている。クロマチン構造の変化は、エピゲノム制御の基盤として、発生、分化、老化などの高次生命機能にも寄与している。代表的なクロマチン構造変換因子の一つとしてヒストンバリアントが存在し、これらはコアヒストンに代わってクロマチンに導入されることで機能する。ヒストンバリアント H2A.Z はヒストン H2A のバリアントで、SRCAP 複合体によってクロマチンに導入され、転写や染色体分配など多様なエピゲノム機能に寄与することが示されている。H2A.Z は、出芽酵母からヒトにまで保存されているが、進化に伴いそのアミノ酸配列の変化も観察される。これまでに、H2A.Z のアミノ酸変化に伴う機能の保存性や変化についての解析は行われていない。そこで本研究では、出芽酵母と脊椎動物の間の H2A.Z の進化的保存性の解析を行った。

これまでに我々は、ニワトリ DT40 細胞の H2A.Z 遺伝子破壊（H2A.Z KO）株および出芽酵母の H2A.Z 欠損（*htz1*Δ）株を確立している。これらの H2A.Z 破壊株に異種 H2A.Z 遺伝子を導入し、遺伝学的相補実験を行った。その結果、H2A.Z KO 脊椎細胞の致死性は、出芽酵母 Htz1 の発現では相補できなかった。同様に *htz1*Δ 酵母株の機能欠陥も、脊椎動物 H2A.Z の発現では相補できなかった。これらの結果は、進化の過程で H2A.Z の機能に何らかの差異が生じたことを示唆している。この機能差について解析する目的で、脊椎動物 H2A.Z と酵母 Htz1 のキメラタンパク質をコードする遺伝子を H2A.Z KO 脊椎動物細胞に導入・解析した。脊椎動物 H2A.Z の SRCAP 複合体認識部位を出芽酵母 Htz1 に置換したキメラ H2A.Z は、SRCAP 複合体に結合可能であり、また H2A.Z KO 脊椎動物細胞の致死性を相補した。この結果は、SRCAP による H2A.Z 導入機構は、酵母と脊椎動物の間で保存されていることを示している。次に、脊椎動物 H2A.Z 中での酵母 Htz1 の置換領域を N 末端側に拡大したところ、致死性相補能やクロマチンへの導入量が大きく減少した。この置換領域には、H2A.Z と H2B の相互作用部位が多く存在する。そこで、H2A.Z と H2B の相互作用が進化的に変化した可能性を考え、脊椎動物 H2B-H2A.Z の連結タンパク質をコードする遺伝子を出芽酵母 *htz1*Δ 株に導入・発現させたところ、Htz1 の機能欠陥が相補された。以上の結果は、H2A.Z の機能自体は進化的に高く保存されている一方で、H2A.Z と H2B の相互作用の様式が進化に伴って変化している可能性を示唆している。

histone variant, molecular evolution, epigenetics

講演番号：2A03p06
講演日時：3 月 18 日 15:25～ A 校舎 03 会場

CRISPR/Cas9 System による、高効率で正確なノックインを可能とするベイト配列の探索
Searching for Bait sequence for enabiling high efficiency and precise knock-in by CRISPR/Cas9 System

○村上 悠[1]、安齋 賢[2]、米村 明莉[1]、木下 政人[1] ([1]京大農、[2]遺伝研)
○Yu MURAKAMI[1], Satoshi ANSAI[2], Akari YONEMURA[1], Masato KINOSHITA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]National Institute of Genetics)

【目的】近年、ゲノム編集技術が確立され、あらゆる生物種において、遺伝子を自由自在に操作し、ノックアウト及びノックインを行うことが広く普及してきている。本研究では、モデル生物であるメダカを用い、ゲノム編集技術の一つである CRISPR/Cas9 System による、相同組み換え(Homologous Recombination)を介したノックインの最適化を試みた。具体的には、ドナープラスミドに含まれる挿入遺伝子の両端に付与する切断配列(＝ベイト配列)の検討を行い、高効率で正確なノックインを可能とするベイト配列の探索を目指した。
【方法】培養細胞の網羅的解析に基づき、切断活性の高い配列をベイト配列の候補配列として 40 個選定した。選んだ候補配列を、12 魚種のゲノムと照合し、Cas-OFFinder を用いてオフターゲット影響の有無を調べ、候補配列の絞り込みを行った。各ベイト配列を有するドナープラスミドを設計し、メダカの骨格筋で高発現する *acta1* を標的遺伝子座として、GFP 遺伝子のノックインを行った。骨格筋で見られる GFP の発現範囲の広さに基づき、各ベイト配列による導入効率を比較した。その中でも BaitD が最も高効率にノックインを誘導した。BaitD の他の遺伝子座での有効性を検証するため、脳で高発現する gap43 遺伝子座へのノックインを試み、F0 での導入効率、生殖系列への伝達率を検証するとともに、塩基配列解析によりノックインの正確性を検討した。
【結果と考察】培養細胞の結果より選定した 40 個の候補配列の中から、オフターゲット影響の少ない 5 個の配列に絞り込んだ。これらのベイト配列を用いた時の、*acta1* へのノックイン効率には顕著な差があり、最高で 19.0%、最低で 2.2%であった。19.0%と最も高効率であった BaitD の導入効率は、一般的に用いられている GFP 由来の G-Bait の約 2 倍であった。また、BaitD を用いて *gap43* へノックインを行った結果も、導入効率が 20.0%と高効率であった。生殖系列へ伝達した個体も確認でき、野生型と交配した F1 個体を用いてシーケンス解析を行った。その結果、挿入遺伝子とゲノムの結合部位において、塩基が挿入又は欠損することなく、正確に GFP 遺伝子がゲノム上の狙った位置に挿入されていることが明らかとなった。以上のことから、BaitD は高効率で正確なノックインを可能にする有用なベイト配列であることが示唆された。加えて、BaitD は主要な 12 魚種のゲノムとほとんど合致しない配列であるため、今後、魚類でノックインを実施する際には、高い導入効率を実現するベイト配列として、積極的に用いられることが期待できる。

CRISPR/Cas9 System, Homologous recombination, Bait sequence

発表責任者：村上悠（you-0347@hotmail.co.jp）

講演番号：2A03p07
講演日時：3 月 18 日 15:40～ A 校舎 03 会場

# ゲノム編集技術を用いた海産養殖魚の品種改良

# Breeding with genome editing technology in aquaculture fish

○岸本 謙太[1]、鷲尾 洋平[2]、豊田 敦[3]、吉浦 康寿[4]、家戸 敬太郎[2]、木下 政人[1]（[1]京大農、[2]近大水研、[3]遺伝研、[4]水研機構瀬水研）
○Kenta Kishimoto[1], Youhei Washio[2], Atsushi Toyoda[3], Yasutoshi Yoshiura[4], Keitaro Kato[2], Masato Kinoshita[1]（[1]Kyoto Univ., [2]Kindai Univ., [3]National Institute of Genetics, [4]Fisheries Research Agency）

【目的】養殖魚は作物や家畜のように品種化が進んでいない。ゲノム編集技術を用いれば、短期間かつ正確に特異的遺伝子破壊による有用形質付与品種の作出が可能になる。本研究では、海産養殖魚であるマダイにおいて CRISPR/Cas9 システムを用いて、骨格筋の分化と成長を抑制的に制御するミオスタチン遺伝子 (*MSTN*) の破壊を行うことで、可食部が増大したマダイ品種の作出を行った。
【方法】*MSTN* のエキソン 1 に single guide RNA (sgRNA)を設計した。この sgRNA (25 ng/ul) を Cas9 RNA (100 ng/ul) とともに人口授精卵 1399 粒にマイクロインジェクション法によって導入した。5.5-6 か月齢の未成熟魚の鰭由来のゲノム DNA を抽出し、ターゲット領域を増幅後、ヘテロ二本鎖移動度分析 (HMA) により、変異導入魚の選抜を行った。変異導入個体を 2 歳齢まで飼育し、鰭由来ゲノム DNA における Amplicon-Sequencing によって各個体の変異導入率を求めた後、変異高率群と変異低率群で尾叉長 (吻から尾鰭の切れ目の長さ) 、体重、Condition Factor を測定した。また、自然産卵法によって変異体同士を交配し F1 世代個体を得た。4 か月齢の F1 鰭由来のゲノム DNA を抽出し、HMA およびシーケンス解析によって、有用変異を有す個体を選抜した。また、133 日齢に上記と同様の測定を行い、*MSTN* 遺伝子破壊による表現型を評価した。
【結果】ゲノム編集導入世代の 5.5-6 か月齢の未成熟魚では 430 尾中 233 尾の個体に変異導入が観察された。2 歳齢の導入魚において、変異高率群と変異低率群では尾叉長に差がなかったが、体重は高率群が有意に大きな値 (1.17 倍) を示し、また、Condition Factor も高率群が有意に大きな値を示した。この結果より導入世代ですでに *MSTN* の遺伝子破壊による骨格筋肥大が観察されていることが示された。162 尾の F1 個体の変異解析の結果、ターゲット領域に遺伝子破壊を促す 8 塩基欠失を有すホモ接合型変異体 6 尾を選抜することに成功した。同時に、同条件下で飼育された同変異型のヘテロ接合型および野生型個体を選抜した。さらに 133 日齢における測定の結果、ホモ接合型個体の Condition Factor はヘテロ接合型および野生型より有意に大きな値を示した。上記の結果によって、筋肉肥大を呈すミオスタチン遺伝子破壊系統の作出に成功したことが示唆された。
【考察】本研究では海産養殖魚において、初めてゲノム編集による特異的遺伝子破壊系統の作出に成功した。すなわち、ミオスタチン遺伝子の破壊によって筋肉増量という期待していた有用形質の付与に成功した。今後は、食品としての機能性や安全性の評価を目的とし、作出した系統を用いて筋肉の成分解析を行う予定である。

Genome editing, CRISPR/Cas9, aquaculture

発表責任者：岸本謙太（kishiken@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A03p08
講演日時：3 月 18 日 15:55～ A 校舎 03 会場

# 医薬品応用を目指したニワトリ由来抗体のヒト化

# Humanization of chicken derived antibody for pharmaceutical application

○庄屋 雄二、斉藤 憲二、石田 有希子、昆 良子、豊浦 雅義、金 武祚 ((株)ファーマフーズ)
○Yuji SHOYA, Kenji SAITO, Akiko ISHIDA, Ryoko KON, Masayoshi TOYOURA, Mujo KIM (Pharma Foods International Co., LTD.)

【背景と目的】

我々は、ニワトリを用いたモノクローナル抗体作製技術として、ALAgene(Avian Lead Antibody gene) technology を確立している。本技術の医薬品応用を目指す場合、免疫原生を低減させる目的でヒト化を行うことが必須であるが、ニワトリ抗体からのヒト化は、多くの場合相補鎖決定領域の移植のみで容易に行える。一方で、ニワトリ抗体の軽鎖はλ型であることから、ヒト化抗体可変領域がκ型由来のフレームワークである場合においては、反応性を維持させることが困難であった。一般的に軽鎖はλ型であるよりκ型である方が、抗体の安定性が向上するなどの利点が多く、抗体医薬品ではκ型の軽鎖が多用される傾向にある。そこで我々は、反応性を維持したまま軽鎖の可変領域及び定常領域がκ型であるニワトリ由来ヒト化抗体の作製を試みた。

【方法】

ヒト化した抗体軽鎖κ型のフレームワークにおいて、vernier zone と呼ばれる抗体の構造維持に重要とされている 11 箇所のアミノ酸に対して、ニワトリ抗体由来のアミノ酸へとバックミューテーションがランダムに入るよう設計された scFv 抗体ライブラリを作製した。本ライブラリを用いて、パニング及びスクリーニングを行い、抗原に対する反応性の高いクローンを取得した。取得したクローンについてアミノ酸配列を決定した。配列を決定したクローンの一部は二価抗体へと組み換え、ELISA により反応性の確認を行った。

【結果】

スクリーニングによって 30 クローンの陽性クローンが得られ、配列を決定した結果、その全てが異なる配列のクローンであった。vernier zone 11 箇所のうち 9 箇所においては、ヒト及びニワトリのどちらの配列もランダムに出現する結果となり、反応性に寄与する箇所ではなかった。残り 2 箇所の vernier zone において、その 1 箇所は、得られた全てのクローンにおいてヒト由来配列からの置換が確認された。また、もう 1 箇所は 29/30 クローンの確率でヒト由来配列からの置換が確認された。その唯一ヒト由来配列が残ったクローンは、二価抗体へと組み換えた際に反応性が消失した。得られたその他のクローンは、二価抗体へと組み換えた際にも、十分な反応性を維持していた。本結果より、ニワトリ抗体軽鎖をヒトκ型のフレームワークへとヒト化することに成功した。更に、κ型へとヒト化する際に、その反応性に大きく寄与する重要なアミノ酸が同定された。

chicken, antibody, humanization

講演番号：2A03p09
講演日時：3 月 18 日 16:10～ A 校舎 03 会場

腸管上皮細胞由来抗菌性レクチン RegIV の腸内フローラ制御機能の解析
Regulation of gut microbiota by RegIV,an antimicrobial lectin secreted from intestinal epithelial cells

○横尾 拓哉[1]、佐藤 道夫[2]、渡辺 寛人[1]([1]明治大農・生命科、[2]明治大農・農芸化)
○Takuya YOKO[1], Michio SATO[2], Hirohito WATANABE[1] ([1]Department of Life science, Meiji Univ., [2]Department of Agricultural chemistry, Meiji Univ.)

【背景・目的】
腸管腔における病原体の排除や腸内フローラの制御においては自然免疫因子、とくに抗菌因子が大きな役割を担っている。われわれは、腸管上皮細胞が分泌する抗菌性レクチンに注目して解析を行い、C 型レクチン様タンパク質である RegIVがグラム陽性菌、グラム陰性菌、および真菌に対して幅広い抗菌活性を発揮することをこれまでに見出している。RegIVの幅広い抗菌作用は腸管における感染防御に大きな役割を担っていると推定されるが、その腸内フローラ制御における意義は不明である。以上の背景から本研究では RegIVの腸内常在菌に対する作用を明らかにすることを目的として解析を行った。

【方法および結果】
ヒト組換え RegIV(rhRegIV)を大腸菌にて発現してこれを精製し、さまざまな乳酸菌株に対する抗菌作用を評価した。その結果、rhRegIVの抗菌活性は菌株によって大きく異なることが示された。とくにヒト腸内に常在するとされる *Lactobacillus gasseri* JCM1131$^T$に対する抗菌活性は微弱であるのに比較して、非常在菌の *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* ATCC11842 に対しては強い抗菌活性を示した。
次に、あらかじめ蛍光色素で標識した乳酸菌株（JCM1131$^T$株および ATCC11842 株）に rhRegIVを作用させ、色素の漏出を指標に細胞膜透過性を評価した。その結果、両菌株において rhRegIVによる細胞膜透過性の亢進が認められた。さらに透過型電子顕微鏡および走査型電子顕微鏡による観察を行ったところ、とくに ATCC11842 株において顕著な細胞膜の形態変化が観察された。

【結論】
腸内常在菌である *Lactobacillus gasseri* JCM1131$^T$は RegIVに対して耐性を示し、一方非常在菌である *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* ATCC11842 は高い感受性を示すことが明らかとなった。このことから RegIVは感染防御だけではなく、選択的な抗菌作用によって腸内フローラを制御する機能をも有する可能性が示唆された。

lectin, intestinal flora, lactobacilli

発表責任者：渡辺　寛人（hwata@meiji.ac.jp）

講演番号：2A03p10
講演日時：3 月 18 日 16:25～ A 校舎 03 会場

# グリセルアルデヒド由来メイラード反応生成物 GLAP による RAGE を介した細胞毒性

# RAGE-mediated cytotoxicity of GLAP, a glyceraldehyde-derived advanced glycation end product

村上 庸人[1]、○倉知 遼太郎[1]、藤野 峻行[2]、臼井 照幸[3]、早瀬 文孝[2]、渡辺 寛人[1]([1]明治大農・生命科、[2]明治大農・農芸化、[3]女子栄養大)
Yoto MURAKAMI[1], ○Ryotaro KURACHI[1], Takayuki FUJINO[2], Teruyuki USUI[3], Fumitaka HAYASE[2], Hirohito WATANABE[1] ([1]Department of Life science, Meiji Univ., [2]Department of Agricultural chemistry, Meiji Univ., [3]Kagawa Nutrition Univ.)

【背景】メイラード反応はタンパク質などのアミノ基と還元糖などのカルボニル基との間で起こる非酵素的反応であり、いくつかの中間体を経て Advanced Glycation End Products（AGEs）を生成する。グリセルアルデヒド(GLA)に由来する AGEs は他の糖に由来する AGEs と比べて高い生理活性を有し、その作用は細胞膜受容体である Receptor for AGEs（RAGE）を介したものであることが明らかとなっているが、実際に RAGE がどのような AGEs 構造を結合エピトープとして認識するかについては不明の点が多い。われわれは GLA より生成する AGEs の構造としては MG-H1、Argpyrimidine、GLAP などを同定しているが、なかでも GLAP 構造が高い細胞毒性を発揮することを明らかにしている。本研究においては、GLAP の RAGE を介した作用を解明すること、および RAGE への結合に必要な最小構造を同定することを目的として解析を行った。

【方法】0.2M GLA と 0.1M 6-aminohexanoic acid を 0.2M リン酸バッファー（pH 7.4）中 50℃で 3 日間反応させた後、逆相 HPLC により精製し GLAP からアミノ基が脱離したアナログ化合物（analog-1）を得た。一方、0.1M 3-hydroxypyridine と 0.1M 6-bromohexanoic acid をアセトン中 80℃で 3 時間反応させた後、逆相 HPLC により精製し GLAP からアミノ基およびヒドロキシメチル基が脱離したアナログ化合物を得た（analog-2)。ラット神経細胞モデル PC12 に対するこれら化合物の細胞毒性を評価するとともに、DAPI 染色による核の形態変化を観察した。さらに、アナログ化合物と RAGE との直接的相互作用について表面プラズモン共鳴法により解析した。

【結果】analog-1、analog-2 を PC12 細胞へ作用させたところ、濃度依存的に細胞毒性が誘発された。またこれら化合物の作用によって、アポトーシスの指標である核の断片化が確認された。一方、リガンドとの結合に必要なヒト RAGE タンパク質細胞外ドメイン（v-RAGE）を組換えタンパク質として調製し、これを共存させたところ、これら化合物の細胞毒性は抑制された。さらに Biacore システムを用いて解析を行ったところ、アナログ化合物と v-RAGE の特異的相互作用が確認された。

以上のことから GLAP 構造が RAGE を介し作用を発揮することが明らかとなった。さらに GLAP 構造中の 3-hydroxypyridinium 構造が RAGE との相互作用に重要である可能性が示唆された。

Advanced Glycation End Products, Glyceraldehyde, Receptor for advanced glycation end products

発表責任者：渡辺寛人（hwata@meiji.ac.jp）

講演番号：2A03p11
講演日時：3 月 18 日 16:50～ A 校舎 03 会場

アコヤガイ稜柱層カルサイト結晶形成に関与するキチナーゼの働き
A work of chitinase related to the formation of calcite crystals of the prismatic layer in *Pinctada fucata*

○近都 浩之[1]、奥村 大河[2]、根岸 瑠美[3]、小暮 敏博[2]、作田 庄平[1]、鈴木 道生[1]([1]東大院・農生科・応生化、[2]東大院・理学科・地惑科、[3]東大・分生研)
○ Hiroyuki KINTSU[1], Taiga OKUMURA[2], Lumi NEGISHI[3], Toshihiro KOGURE[2], Shohei SAKUDA[1], Michio SUZUKI[1] ([1]Graduate school of agricultural and life sciences, the Tokyo Univ., [2]Graduate school of science, the Tokyo Univ, [3]Institute of molecular and cellular biosciences, the Tokyo Univ.)

【目的】アコヤガイの貝殻は異なる構造の 2 層から形成されており、外側の層に炭酸カルシウムのカルサイト結晶から成る稜柱層構造を有している。稜柱層において、厚い有機基質の枠組みで囲われた個々の柱状結晶は複数の単結晶性のカルサイト結晶で構成されているが、それらカルサイト結晶の内部にはさらに微量の有機物がネットワーク状に存在している。その微量有機物ネットワークに沿って結晶方位の微小な歪みが形成されることで、結晶が断裂するへき開を防ぎ、貝殻の強度を増していると考えられている。この有機物ネットワークが単結晶に微小な結晶欠陥を引き起こすと考えられているが、有機物ネットワークの構成成分や微小結晶欠陥の形成メカニズムは明らかになっていない。そこで本研究では、有機物ネットワークに着目し、微小結晶欠陥の形成メカニズムを解明することを目的とした。
【方法と結果】有機物ネットワーク成分を同定するため、稜柱層カルサイト結晶を酢酸で脱灰し、さらにネットワーク成分と考えられる酸不溶成分を変性剤処理することで変性剤可溶性および不溶性成分に分離した。酸可溶性と変性剤可溶性成分を SDS-PAGE で比較し、ネットワーク成分として変性剤可溶性に特異的に含まれるバンドを見いだした。このバンドを LC-MS/MS で解析したところ、キチン分解酵素のキチナーゼであることが明らかになった。また IR 測定により不溶性成分には多糖のキチンが含まれていることが判明した。これらに結果から、稜柱層内ではキチン分解酵素がキチンに作用して細くすることでネットワーク状のゲルにし、それがカルサイトの内部に微小結晶欠陥を引き起こしていることが考えられた。
稜柱層カルサイト結晶形成におけるキチン分解活性の重要性を調べるため、アコヤガイ生体とキチナーゼ特異的阻害剤であるアロサミジンを用いた *in vivo* での実験を行った。海水で飼育中のアコヤガイの貝柱に 4 日毎にアロサミジンをインジェクションし、4 日後と 1 か月後の個体の外套膜からタンパク質を抽出しキチナーゼの活性を測定した。PBS インジェクション個体と比較してアロサミジンインジェクション個体の活性はそれぞれ有意に減少したことから、生体内のキチナーゼ活性は常に抑えられていたことが示された。さらに SEM による稜柱層の表面構造の観察から、アロサミジンインジェクション個体は柱状カルサイト周囲の有機基質の枠組みが乱れて歪な稜柱層を形成しており、また TEM による断面の観察から、有機物ネットワークが太くなっていることが判明した。以上の結果より、稜柱層の形成にはキチナーゼによるキチン分解活性が重要な働きをしていることが示唆された。

biominralization, chitinase, calcite

講演番号：2A03p12
講演日時：3 月 18 日 17:05～ A 校舎 03 会場

アコヤガイ(*Pinctada fucata*)の真珠層石灰化に関与するカルシウムイオン応答タンパク質の同定と機能解析

The identification and functional analysis of calcium ion response proteins which participate in calcification of pearl layer in pearl oyster, *Pinctada fucata*

○松浦 晃宙[1]、吉村 航[1]、渥美 貴史[2]、土橋 靖史[3]、竹内 猛[4]、佐藤 矩行[4]、根岸 瑠美[1]、作田 庄平[1]、井村 祐己[1]、吉村 悦郎[5]、鈴木 道生[1] ([1]東大院農、[2]三重県庁、[3]三重水研、[4]OIST、[5]放送大教養)

○Akihiro MATSUURA[1], Koh YOSHIMURA[1], takashi ATSUMI[2], yasushi TSUCHIHASHI[3], Takeshi TAKEUCHI[4], Noriyuki SATO[4], Rumi NEGISHI[1], Shohei SAKUDA[1], Yuki IMURA[1], Etsuro YOSHIMURA[5], Michio SUZUKI[1] ([1]Grad. Sch. Tokyo Univ., [2]Mie Pref. off., [3]Mie Pref. Fish. Res. Inst., [4]OIST, [5]OUJ)

【目的】アコヤガイ(*Pinctada fucata*)は日本で真珠養殖に利用される貝類であることから、軟体動物の中でも最も研究が行われている。軟体動物の貝殻は環境海水中のカルシウムイオンを炭酸カルシウムとして鉱物化することで形成されており、炭酸イオンは食餌から得られることが知られている [1]。アコヤガイの貝殻は外側に稜柱層、内側に真珠層と異なる層構造を有しており、それぞれの層は軟体部の外套膜から分泌されるカルシウムイオン、炭酸イオン、各層に特異的な有機基質によって形成される。この有機基質がそれぞれの層構造、すなわち貝殻形成に関与していると考えられている。このような、貝殻形成に関与する貝殻中の有機基質は数多く同定されている一方で、外套膜において貝殻の石灰化を制御する因子についてはほとんど研究されていない。そこで、本研究では外套膜において環境水中のカルシウムイオンに応答し、貝殻形成を制御する因子の探索を目的とした。

【実験・結果】カルシウムイオンの濃度を天然海水の 1 倍、10 倍にした人工海水でアコヤガイを 1 週間飼育した。飼育後の貝殻表面を走査型電子顕微鏡で観察したところ、カルシウムイオン濃度が 10 倍の条件において真珠層への粒子状の結晶が異常に沈着していることが確認された。この沈着は真珠層の炭酸カルシウムと同じアラゴナイト結晶であり、さらに直下の真珠層のアラゴナイト結晶の結晶方位を反映していることから、液中でランダムに生成し沈着したのではなく、真珠層表面で石灰化が促進されエピタキシャル成長したものだと考えられる。この結果は海水のカルシウム濃度の変化が、外套膜における貝殻の石灰化に関与するタンパク質の発現量に影響を及ぼしている可能性を示唆している。そこで、各条件で飼育後のアコヤガイの外套膜組織からタンパク質を抽出し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いて発現タンパク質の比較を行った。その結果、カルシウムイオンの濃度が 10 倍の条件において発現が上昇する 2 種類のタンパク質が確認され、これらを質量分析法により同定した。同定されたタンパク質はアコヤガイにおいて貝殻形成をコントロールする上で重要な因子であることが予想されるため、RNAi による遺伝子ノックダウンや組換え体を用いた実験系でそれらの機能解析を試みている。さらに、次世代シークエンサーMiseq を用いて各条件の RNA-Seq を行い、環境カルシウムに応答する遺伝子の網羅的解析を行い、アコヤガイのカルシウム応答に関して、より詳細なメカニズムの解明を試みている。

[1]Matsumura, A. Wada, K. Yamamoto, M. and Akano, T.(1994)

*Pinctada fucata*, biomineralization, environmental response

発表責任者：鈴木道生（amichiwo@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A03p13
講演日時：3 月 18 日 17:20～ A 校舎 03 会場

ウロコフネタマガイ（*Chrysomallon squamiferum*）由来の鉄結合物質の探索
Isolation and identification of Iron-binding compounds from *Chrysomallon squamiferum*
○松田 大輝[1]、有賀 智子[1]、鈴木 庸平[2]、根岸 瑠美[1]、井村 祐己[1]、吉村 悦郎[3]、鈴木 道生[1]([1]東大院農、[2]東大院理、[3]放送大教養)
○Hiroki MATSUDA[1], Tomoko ARIGA[1], Yohey SUZUKI[2], Rumi NEGISHI[1], Yuki IMURA[1], Etsuro YOSHIMURA[3], Michio SUZUKI[1] ([1]Grad. Sch. Agri. Life Sci. Tokyo Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Tokyo Univ., [3]OUJ)

【背景・目的】ウロコフネタマガイ(*Chrysomallon squamiferum*)は、中央インド洋海嶺「かいれいフィールド」の熱水噴出孔付近で発見された深海性の巻貝である。この巻貝は軟体部の腹足の表面にナノ粒子状の硫化鉄(pyrite, FeS2)を含む鱗状の構造を持ち、外殻は炭酸カルシウム層上が硫化鉄層で覆われている。pyrite ナノ粒子は優れた光起電力特性を持ち、太陽光発電などへの応用が期待されている物質である。金属ナノ粒子の生成には、粒子が凝集し、マクロ化することを防ぐ分散剤の存在が重要であると考えられているが、pyrite ナノ粒子に関しては適切な分散剤は見つかっておらず、安価かつ安定した化学的合成手法はいまだ確立していない。そのため生物の有する pyrite ナノ粒子の生成機構の解明および工業的応用が期待されている。そこで本研究では、ウロコフネタマガイの生体中において pyrite ナノ粒子に結合し、凝集を防ぐ鉄結合能を持つ物質の同定、並びにそれを用いた pyrite ナノ粒子の *in vitro* での合成を目的としている。

【概要】本研究ではウロコフネタマガイの鱗状構造及び外殻より抽出された有機物質を分析し、鉄との相互作用により pyrite ナノ粒子の生成に関わる因子の探索を行った。

鱗状構造について、酸性条件において難溶である pyrite を嫌気条件下で亜鉛と三価クロムを用いて還元することで溶解した。溶解液中には HPLC ポストカラム法を用いた鉄結合物質探索法により鉄と結合能をもつ低分子有機物が大量に含まれていることが判明した。この低分子有機物に対し陽イオン交換樹脂、逆相クロマトグラフィーを用いることで単離・精製を行った。単離された低分子有機物に対して質量分析法や NMR を用いることでその構造決定を試みた。

外殻においては 1 M 酢酸を用いて炭酸カルシウム層を溶解した後、酢酸不溶である硫化鉄層に対し SDS/DTT を用いた抽出を行った。この外殻由来の抽出液に対し SDS-PAGE を行ったところ硫化鉄層に特異的なバンドが得られた。このバンドは LC-MS/MS 解析によりミオグロビン様タンパクであることが判明した。ミオグロビンはヘムを持ち、鉄と結合して生体内で酸素貯蔵に関わることが知られており、この外殻由来のタンパクも鉄との結合に関与していると考えられる。

これらのウロコフネタマガイの硫化鉄構造から得られた、鉄との親和性が高い物質は硫化鉄構造の形成、及び硫化鉄のナノ粒子化に深く関わっていると予想される。現在、こうした鉄結合能が高いと考えられる物質を用いることで *in vitro* での pyrite ナノ粒子の生成を試みている。

Chrysomallon squamiferum, Iron-binding, pyrite nanoparticle

発表責任者：鈴木道生（amichiwo@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A03p14
講演日時：3 月 18 日 17:35～ A 校舎 03 会場

モデル生物としてのメダカにおける血液凝固に必須なタンパク質架橋化酵素の機能解析
Characterization of medaka transglutaminase orthologue essential for blood coagulation
○人見 清隆、堀水 里麻、奥谷 冬穂、渡邊 優子、辰川 英樹（名大院創薬）
○ Kiyotaka HITOMI, Rima HORIMIZU, Kazuho OKUYA, Yuko WATANABE, Hideki TATSUKAWA (Nagoya Univ. Grad. Sch. Pharm. Sci.)

【背景・目的】
タンパク質架橋化酵素であるトランスグルタミナーゼ（以下 TGase）は、カルシウムイオン依存的に、特定のタンパク質中のグルタミン残基とリジン残基間に不可逆なイソペプチド結合を形成させる。ヒトでは 8 つのアイソザイム（Factor XIII, TG1-TG7）が組織特異的に存在し、表皮形成や血液凝固などをはじめ、多彩な生理的役割を果たしている。しかしながら、疾患への関与も含めて未知な機能も解明されずに残されている。生理的意義を明らかにするためには、酵素反応で架橋される基質の探索に加え、モデル生物での発現様式解析や遺伝子変異体での表現型解析が有効である。
ニホンメダカ（*Oryzias latipes*）は、現在全ゲノム配列が決定され、飼育やゲノム編集の容易さから創薬関係の研究においても近年注目されているモデル生物である。これまで我々はメダカにおいて TGase に対するオルソログの存在を見出している。本発表では、血液凝固に必須な TGase である Factor XIII(FXIII) のホモログと考えられる OlTGB に対象に、関連疾患モデル系の確立を最終目的に、その生化学的解析やゲノム編集による変異体の作製を目的とした。
【方法・結果】
生化学的解析のため、昆虫細胞―バキュロウイルス発現系によって OlTGB の組換えタンパク質を取得した。酵素活性について検討したところ、ヒトの FXIII と同様に、血液凝固系で働く主要なプロテアーゼ（トロンビン）による限定分解を受けて活性化されることを確認した。また、取得した組換えタンパク質を抗原としてポリクローナル抗体を作製し、パラフィン包埋されたメダカの全身組織切片を用いて免疫染色を行い発現部位を解析した。その結果、咽頭腔・脊椎骨・遠端鰭骨において強いシグナルが見られた。さらに組織抽出液を用いた Western Blotting では、腎臓や鰓（えら）にも特異的なシグナルを確認した。
その一方でゲノム編集法として有効な CRISPR/Cas9 システムを用いて、OlTGB の変異体メダカの作製を行った。該当する遺伝子に特異的が切断されるように必要な guide RNA 及び Cas9 mRNA を作製してメダカ受精卵に注入し、変異導入について遺伝子解析を並行しつつ生育させた。その結果、変異体として 2 種類のメダカを取得した。変異体での OlTGB の発現の欠損を確認し、現在は表現型の解析として、架橋される基質（フィブリン）や骨形成を対象に検討を進めている。
Kikuta et al. PLoS One 2015 10(12):e0144194

transglutaminase, coagulation, medaka

発表責任者：人見清隆（hitomi@ps.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2A03p15
講演日時：3 月 18 日 17:50～ A 校舎 03 会場

肝線維化におけるタンパク質架橋化酵素の役割
Role of transglutaminases in the progression of liver fibrosis
○中川 晴加[1]、谷 優治[2]、大津 里紗[2]、辰川 英樹[2]、人見 清隆[2]([1]名大農、[2]名大院創薬)
○Haruka NAKAGAWA[1], Yuji TANI[2], Risa OTSU[2], Hideki TATSUKAWA[2], Kiyotaka HITOMI[2]
([1]Nagoya Univ. Fac. Agric., [2]Nagoya Univ. Grad. Sch. Pharm. Sci.)

【背景・目的】
線維化とは、コラーゲンなどの線維性タンパク質が過剰に蓄積し、柔軟な組織が硬化することで恒常的な機能を失う疾患である。タンパク質架橋化酵素トランスグルタミナーゼ（TGase）がコラーゲンの架橋による安定化や潜在型 TGF-β の活性化を介して線維症の病態形成に寄与することが報告されているが、病態発症に関連する TGase の活性分布や基質タンパク質など、詳細な分子機構は未だ明らかではない。本研究では、肝線維症モデルマウスを用いて、病態進行に伴う TGase の役割を解明し、肝疾患の新たな治療や予防法に繋げることを目的とした。
【結果・考察】
8 週齢の ICR 雄マウスに胆管結紮を行い、肝線維症を誘導した。解析には未処理のもの、処理後 3、7、14 日間が経過したマウスの肝臓を使用した。線維化の進行程度について、組織学的解析及びマーカー遺伝子・タンパク質の発現量の変化を確認した結果、胆管結紮の処理後の日数に応じて上昇が認められた。肝組織における TGase アイソザイム全てについて mRNA の発現を確認したところ、TG1、TG2 のみ発現上昇が認められ、またタンパク質レベルでも同様に線維化に伴って発現量の上昇が見られた。さらに、アイソザイム特異的に架橋される基質ペプチドを用いて、TG1、TG2 の活性評価を行ったところ、線維化組織での活性上昇が確認された。同様に基質ペプチドを用いた活性染色により、TG1 は肝組織の広範囲に、TG2 は門脈近傍で強く、その後に線維化の進行において広範囲の領域で確認され、アイソザイム間で活性分布に違いが見られた。TGase の阻害剤を投与した線維化誘導マウスでは、肝組織内のコラーゲン量が減少し、線維化に対する抑制効果が見られた。さらに、基質ペプチドと架橋した肝組織中の基質タンパク質について解析を行ったところ、線維化の進行に伴って新規に同定される TG1、TG2 それぞれの基質タンパク質が見られた。同定された基質候補タンパク質の中には肝障害のマーカーとして知られるサイトケラチン 18（CK18）が含まれており、CK18 と二量体を形成する CK8 と共に発現量の確認を行ったところ、線維化に伴うこれらの発現量や架橋産物の増加が見られた。現在、CK18 及び CK8 の組換え精製タンパク質を作製して生化学的解析を進めると共に、TGase と肝線維化の関係性について細胞レベルでの検討を行っている。

transglutaminase, liver, fibrosis

発表責任者：人見清隆（hitomi@ps.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2A03p16
講演日時：3 月 18 日 18:05～ A 校舎 03 会場

# hSOCS2 タンパク質の 30 番目のセリンのリン酸化は自身の分解を促進する

# Phosphorylation of the hSOCS2 protein at serine 30 promotes its degradation.

○宮本 梓[1]、舛廣 善和[1,2]、関 泰一郎[1,3]、司馬 肇[1,2] ([1]日大院生物資源科学応用生命、[2]日大生物資源科学応用生物、[3]日大生物資源科学生命化学)
○Azusa MIYAMOTO[1], Yoshikazu MASUHIRO[1,2], Taiichiro SEKI[1,3], Hajime SHIBA[1,2] ([1]Nihon Univ. Graduate school of Bioresources sciences Department of Applied life science, [2]Nihon Univ. College of Bioresources sciences Department of Applied biological science, [3]Nihon Univ. College of Bioresources sciences Department of Chemistry and life science)

サイトカインシグナル抑制因子(SOCS)タンパク質群は、JAK/STAT シグナル経路の負の制御因子である。このうち、SOCS2 は主に成長ホルモンシグナル経路を抑制する。近年、SOCS2 の 30 番目のセリン残基(S30)が網羅的プロテオーム解析によりリン酸化修飾されることが報告された。一方で、いくつかのタンパク質において phospho-デグロンと言われるリン酸化依存的なタンパク質の分解が知られている。しかしながら、SOCS2 に関する詳細な分解機構は不明ある。本研究では S30 のリン酸化が SOCS2 自身の分解に及ぼす影響について研究した。

Flag-hSOCS2(WT)および S30A(リン酸化修飾されないアラニン変異体)を作製後、HEK293T 細胞に強制発現させ、翻訳阻害剤シクロヘキシミドを添加し経時的なタンパク質分解を調べた。その結果、半減期は WT が 0.3 時間、S30A は 9.4 時間であった。また、WT においてシクロヘキシミドとプロテアソーム阻害剤 MG-132 を共処理すると、その半減期は 13.2 時間であった。

以上の結果から、SOCS2 における S30 のリン酸化は自身のプロテアソーム分解に大きく関与しており、phospho-デグロンであると考えられた。また、SOCS2 の S30 周辺領域は MAPK/CDK リン酸化部位の認識配列に類似していることから、成長因子による増殖シグナル刺激が SOCS2 タンパク質の分解を促進することでそのシグナル伝達を優位に伝達する可能性が明らかになった。

SOCS2, Phosphorylation, Degradation

講演番号：2A04a01
講演日時：3 月 18 日 09:20～ A 校舎 04 会場

# 畑で作る高栄養価タンパク質の開発と食品用途

# Development of highly nutritious protein made in field and food application

○横田 明穂[1]、三林 有紀[1,2]、小川 太郎[1,3]、土井 安[4]、和田 宗隆[4]、吉村 守[5]、福本 拓元[3]、出村 拓[2]、西永 正博[1] ([1]植物ハイテック研、[2]奈良先端大バイオ、[3]ユーグレナ、[4]パンドラファームグループ、[5]大和ハウス)
○Akiho Yokota[1], Yuki Mitsubayashi[1,2], Taro Ogawa[1,3], Yasushi Doi[4], Munetaka Wada[4], Mamoru Yoshimura[5], Takuyuki Fukumoto[3], Taku Demura[2], Masahiro Nishinaga[1] ([1]Plant Hi-Tech Inst., [2]Nara Inst. Sci. Tech., [3]euglena, [4]Pandora Farm Group, [5]Daiwa House Industry)

[目的] ヒトにとって三大栄養素とは糖質、タンパク質及び脂質である。この内、タンパク質は日々体内から排泄される量に見合うタンパク質が食品として摂取されなければならない。その際、食品に要求される必須アミノ酸量はヒトの遺伝情報が決める量であることは言うまでもない。ヒトが 1 日に摂取する必要があるタンパク質量は約 60 g で、筋力強化中のスポーツ選手では日々90～120 g 程度のタンパク質を摂取しなければならない。

ヒトのタンパク質源は進化系統樹上できるだけ近縁な生物由来が望ましい。しかし、動物性タンパク質の摂取は不可避的に大量の脂質摂取を伴い、スポーツ選手や食の細い高齢者には避けたいタンパク質源である。もし、生物学的には遠縁種（例えば作物）であっても、ヒトの必須アミノ酸要求量を満たすタンパク質を大量に合成している生物は、有望なタンパク質供給作物になるだろう。本研究では、光合成 $CO_2$ 固定酵素ルビスコがヒトの必須アミノ酸に富むことに着目し、高栄養価タンパク質源ルビスコの食品用途での可能性を研究したので報告する。

[方法] ルビスコのヒトの必須アミノ酸含量と構成比は、ルビスコ遺伝子（*rbc*L 及び *rbc*S）の塩基配列から予測される大小両サブユニットの全長配列から求めた。ルビスコを高濃度に含み、栽培面積当たりの収穫量が多い作物に着目し、食品製造に使用される薬品のみを用いて部分精製する方法を確立した。部分精製したルビスコ高含量抽出液は凍結乾燥後に乾燥下で保存し、各種食品用途開発に利用した。

[結果・考察] 分子質量 550 kDa のルビスコは葉緑体に 0.5 mM の濃度で含まれている緑葉タンパク質である。平成 26 年の政府統計によると、葉物野菜ではキャベツの作付面積は 34,700 ha、10 a 当たりの生産高は 4.3 トンで、全国で 140 万トン生産されている。野菜として出荷されるキャベツは黄緑色でルビスコ含量は低いが、深緑色の外葉は 10 a 当たり 1.7 トンに達しルビスコ含量も高いが廃棄されている。キャベツ外葉を収穫後に水洗し、温水中で葉緑体膜を変性させるとともにプロテアーゼを失活させた。ブレンダーで外葉破砕後に遠心して抽出液を得た。この状態でルビスコは全抽出タンパク質の 82%を占めた。抽出ルビスコ両サブユニットの分子質量はアミノ酸配列から算出されるものに相当し、大サブユニットの *N*-末端は翻訳後修飾を受けたままであったことから、ルビスコタンパク質は高栄養価を保持した状態で調製できたと結論した。キャベツルビスコ標品は各種スープや豆乳マヨに加え、その栄養価を評価した。

food protein source, Rubisco, veggie protein

発表責任者：横田明穂（yokota@bs.naist.jp）

講演番号：2A04a02
講演日時：3 月 18 日 09:35～ A 校舎 04 会場

# アミノ酸欠乏による fibroblast growth factor 21 発現増加機構の解析

# Analysis of the Mechanism for Increased Fibroblast Growth Factor 21 Expression in Response to Amino Acid Starvation

○島村 紘平[1]、増澤（尾﨑） 依[2]、竹中 麻子[1]([1]明治大農、[2]日大生資科)
○Kohei SHIMAMURA[1], Yori OZAKI-MASUZAWA[2], Asako TAKENAKA[1] ([1]Meiji Univ., [2]Nihon Univ.)

【背景と目的】

我々はこれまでに、低タンパク質食摂取がラットの fibroblast growth factor (FGF) 21 の肝臓 mRNA 量と血中濃度を増加させ、脂質代謝を制御することを明らかにした。また、ラット肝臓由来 RL-34 細胞をアミノ酸欠乏培地で培養すると FGF21 mRNA 量が増加することから、肝細胞がアミノ酸欠乏に直接応答して FGF21 発現が誘導されることを示した。アミノ酸欠乏による FGF21 発現上昇には転写因子 ATF4 の関与が報告されているが、ATF4 活性化機構の詳細は明らかにされていない。そこで本研究では、ATF4 活性化機構として GCN2 活性化と小胞体ストレスに注目し、アミノ酸欠乏に応答した FGF21 発現増加機構の解析を行った。

【方法】

RL-34 細胞をアミノ酸含有(AA+)あるいは不含(AA-)の無血清 MEM 培地で 24 時間培養し、FGF21 mRNA および ATF4 量を測定した。また、経時的に FGF21、ATF4、ATF4 標的遺伝子（ASNS、PSPH、PHGDH)、小胞体ストレス応答性遺伝子（CHOP、BiP、XBP-1、GRP94）の mRNA 量を解析した。さらに siRNA を用いて ATF4、GCN2 を発現抑制した際の遺伝子発現量を同様に解析した。

【結果・考察】

AA-での培養 24 時間で FGF21 mRNA 量および ATF4 量が増加した。ATF4 mRNA 量は AA-での培養 3 時間以降増加し、FGF21 mRNA 量は 12 時間以降に顕著に増加した。ATF4 標的遺伝子の発現は AA-で増加したが、小胞体ストレス応答性遺伝子発現は変化しなかったことから、ATF4 活性化は小胞体ストレスによって生じるものではないと考えられた。siRNA で ATF4 発現を抑制した細胞では AA-に応答した FGF21 mRNA 量の増加が見られなくなったことから、FGF21 発現増加は ATF4 を介して生じることが示された。一方、GCN2 発現抑制による FGF21 発現増加の解除は部分的であったことから、AA-による ATF4 活性化には GCN2 以外の因子も関与すると考えられた。AA-ではストレス応答性転写因子である CHOP が ATF4、GCN2 非依存的に発現上昇することが明らかになり、CHOP を介した ATF4 活性化経路が存在する可能性が考えられた。以上の結果から、アミノ酸欠乏に応答した FGF21 発現増加は ATF4 活性化を介して生じるが、培養細胞では GCN2 と GCN2 以外のストレス応答経路がいずれも ATF4 活性化に寄与している可能性が示された。

Amino Acid Starvation, FGF21, ATF4

発表責任者：竹中麻子（takenaka@meiji.ac.jp）

講演番号：2A04a03
講演日時：3 月 18 日 09:50～ A 校舎 04 会場

# L-シトルリンの経口投与により転写共役因子依存的にマウス骨格筋の血管数が増加した

# L-citrulline increased blood vessel number in PGC1-α dependent manner in murine skeletal muscle

○森本 茉穂[1]、畑澤 幸乃[1,2]、大西 拓己[1]、南 貴美子[1]、鈴木 貴視[3]、森田 匡彦[3]、亀井 康富[1] ([1]京府大、[2]日本学術振興会、[3]協和発酵バイオ株式会社)
○Maho MORIMOTO[1], Yukino HATAZAWA[1,2], Takumi ONISHI[1], Kimiko MINAMI[1], Takashi SUZUKI[3], Masahiko MORITA[3], Yasutomi KAMEI[1] ([1]Kyoto Prefectural Univ., [2]Japan Society for the Promotion of Science, [3]KYOWA HAKKO BIO CO.)

【背景】生体において L-シトルリンの摂取は一酸化窒素（NO）を増加させることが知られている。NO には血流促進作用があり、持久運動能力の向上が期待される。一方で NO は骨格筋において転写共役因子 PGC1α の活性化によりミトコンドリアを増加させるとの報告がある。また、PGC1α を発現増加させた遺伝子改変マウスでは、骨格筋の血管数が増加することが報告されている。本研究において我々は野生型マウスおよび骨格筋特異的 PGC1α 欠損（PGC1αKO）マウスを用いて、L-シトルリン摂取により持久運動能力やミトコンドリア量、血管数が変化するかどうか調べた。
【方法】8 週齢雄性の野生型マウス及び PGC1α-KO マウスを、コントロール群（CE-Ⅱ固形食摂取）と L-シトルリン群（1 %（w/w）L-シトルリン含有 CE-Ⅱ固形食摂取）に 1 群 6~8 匹に群わけし、回転かごで 30 日間飼育した。３週間後に蒸留水または L-シトルリン（500 mg/kg）を強制経口投与し、1 時間後にトレッドミルによる走行試験を行い、疲労困憊までの時間を測定した。その 1 週間後、蒸留水または L-シトルリン（500 mg/kg）を強制経口投与し、1 時間後にトレッドミルによる走行を 30 分間行った。その 3 時間後に骨格筋を採取し、遺伝子発現および組織染色を解析した。
【結果・考察】トレッドミル試験において L-シトルリンによる走行持続時間の変化は見られなかった。しかし、遺伝子型に関係なく L-シトルリン投与により回転かごによる自発的運動の増加が観察された。一方で、本条件では、L-シトルリン摂取により骨格筋において PGC1α の発現やコハク酸デヒドロゲナーゼ染色（ミトコンドリアの活性マーカー）は変化しなかった。興味深いことに、血管マーカーである CD31 の免疫染色において L-シトルリン摂取により野生型マウスで、骨格筋の血管数の増加が観察された。一方、PGC1α-KO マウスでは野生型マウスに比べて L-シトルリンによる顕著な血管数の増加は観察されなかった。これらの結果から L-シトルリンは PGC1α 依存的に血管を増やすことが示唆された。

PGC1-α, L-citrulline, Nitric oxide

講演番号：2A04a04
講演日時：3 月 18 日 10:05～ A 校舎 04 会場

# 骨格筋において PGC-1α が分岐鎖アミノ酸による mTOR シグナルの活性化を媒介する
# Branched-chain amino acids activate mTOR signaling through PGC-1alpha in skeletal muscle.

○南 貴美子、吉村 亮二、亀井 康富（京府大農）
○Kimiko MINAMI, Ryoji YOSHIMURA, Yasutomi KAMEI (Kyoto prefectural Univ.)

【背景・目的】骨格筋は人体最大の組織であり、運動やエネルギー代謝、糖取り込みに役割を果たす。骨格筋量はタンパク質の合成・分解のバランスにより制御され、肥大や萎縮を起こす。分岐鎖アミノ酸（BCAA：ロイシン、イソロイシン、バリン）はmTORを活性化することが知られており、活性化されたmTORは、4E-BP1やS6K1をリン酸化して、翻訳（タンパク質合成）を促進する。様々な筋萎縮条件において、BCAA摂取が筋萎縮を軽減する報告がある。骨格筋特異的mTOR欠損マウスは進行性のミオパチーを発症し、骨格筋のミトコンドリアの減少と、それに伴う酸化的能力の著しい低下が報告されている。転写共役因子PGC-1α はミトコンドリア生合成のマスターレギュレーターであり、この発現はmTOR欠損マウスの骨格筋において減少していることが報告されている。
PGC-1α は運動により骨格筋において発現増加し、ミトコンドリア生合成や脂肪酸酸化、分岐鎖アミノ酸（BCAA）代謝を活性化させる機能がある。PGC-1α を骨格筋特異的に過剰発現するマウスは、骨格筋のミトコンドリア機能が増加し、顕著な赤筋化を示す。加えて、筋特異的PGC-1α 過剰発現マウスは除神経や絶食に誘導される筋萎縮に抵抗性を示すことが報告されている。
PGC-1α がBCAA-mTOR軸のタンパク質合成経路を媒介している可能性について、骨格筋特異的PGC-1α 欠損（PGC-1α 筋KO）マウスを用いて検証した。

【方法・結果】PGC-1α を骨格筋で特異的に欠損したPGC-1α 筋KOマウスを作製した。ミトコンドリアを特徴づけるコハク酸デヒドロゲナーゼ染色やクエン酸合成酵素活性測定の結果、このマウスの筋肉におけるミトコンドリア機能の減少が示唆された。また、PGC-1α 筋KOマウスは持久運動能力が低かった。
PGC-1α 筋KOマウスに1.35 mg/g body weightのロイシンを経口投与30分後、骨格筋を採取し、ウエスタンブロット法を用いて、mTOR活性を4E-BP1リン酸化レベルで評価した。コントロールの野生型マウスではロイシン投与によって4E-BP1のリン酸化レベルが増加したが、PGC-1α 筋KOマウスの骨格筋ではロイシンによる4E-BP1リン酸化増加が少なかった。ロイシンによるmTOR活性化をPGC-1α が媒介している事が示唆された。BCAAによるmTOR活性化が実際にタンパク質の合成促進を伴うかについて解析中である。

PGC-1alpha, branched-chain amino acids, skeletal muscle

講演番号：2A04a05
講演日時：3 月 18 日 10:20～ A 校舎 04 会場

# 2 型糖尿病モデル ZDF ラットの骨・ミネラル代謝異常に対する米糠タンパク質の有効性

# Beneficial effect of rice bran protein on disorder of mineral and bone metabolism in type 2 diabetic ZDF rats

○菅木 省吾[1]、久保田 真敏[2]、渡邊 令子[3]、橋本 博之[4]、原田 幸和[4]、細島 康宏[5]、斎藤 亮彦[5]、笹川 一郎[6]、藤村 忍[1,2]、門脇 基二[1,2]（[1]新潟大院自然研、[2]新潟大農、[3]新潟県立大、[4]築野食品工業基礎研、[5]新潟大院医歯、[6]日本歯大新歯）

○ Shogo SUGAKI[1], Masatoshi KUBOTA[2], Reiko WATANABE[3], Hiroyuki HASHIMOTO[4], Yukikazu HARADA[4], Michihiro HOSOJIMA[5], Akihiko SAITO[5], Ichiro SASAGAWA[6], Shinobu FUJIMURA[1,2], Motoni KADOWAKI[1,2] ([1]Graduate School of Sci. and Tech., Niigata Univ., [2]Niigata Univ., [3]University of Niigata Prefecture, [4]Tsuno Food Industrial Co., Ltd., [5]Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata Univ., [6]School of Life Dentistry at Niigata, The Nippon Dental Univ.)

【背景・目的】 糖尿病患者では骨折リスクが増加することが知られており、高血糖による酸化ストレスが、骨形成の低下や骨構造および骨コラーゲンの劣化を招き、骨が脆弱化すると考えられている。また、糖尿病合併症である糖尿病性腎症を含む慢性腎臓病（CKD）は、腎機能低下に伴い、血中 P 濃度の上昇などによるミネラル代謝異常が、骨代謝異常のみならず、血管の石灰化等を介して生命予後に大きな影響を与えることが認識され、CKD に伴う骨・ミネラル代謝異常（CKD-MBD）と呼ばれている。このように糖尿病や糖尿病性腎症の進行は、骨折リスクの増加因子であると考えられている。当研究グループは、既に米糠タンパク質（RBP）が糖尿病および糖尿病性腎症の進行を遅延させることを報告しており、ミネラルおよび骨代謝の異常を軽減する可能性が期待された。そこで本研究では、肥満 2 型糖尿病モデル Zucker Diabetic Fatty（ZDF）ラットを用いて CKD-MBD に対する RBP の影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】 7 週齢雄性 ZDF ラットに 20%カゼイン（C）または RBP 食を 10 週間給与した。糖尿病への影響を評価するためにヘモグロビン A1c（HbA1c）を測定し、さらに糖尿病性腎症に与える影響を検討するために尿中アルブミン排泄（UAE）を経時的に測定した。またミネラル代謝への影響を検討するために、血清 Ca および P 濃度を測定し、これら血中ミネラル濃度を調節するホルモンである副甲状腺ホルモン（PTH）および線維芽細胞増殖因子（FGF）23 を測定した。さらに骨微細構造への影響を評価するために、マイクロ CT を用いて大腿骨の骨密度（BMD）、海綿骨体積率（BV/TV）、骨梁幅（Tb.Th）、骨梁数（Tb.N）、骨梁間隙（Tb.Sp）、皮質骨厚さ（Ct.Th）、皮質骨体積率（CV/AV）などのパラメータを計測した。

【結果・考察】 RBP 群は C 群と比較して、HbA1c および UAE が有意に低値を示し、糖尿病および糖尿病性腎症の進行遅延作用を有していることが確認された。また血清 Ca および P 濃度には変化はみられなかったものの、CKD-MBD で高値を示すことが知られている血清 PTH、FGF23 濃度が RBP 群で有意に低値を示した。さらに大腿骨のマイクロ CT 解析から、C 群では BV/TV、Tb.N、Ct.Th が減少し骨微細構造の劣化が確認されたが、RBP 群ではこれらの劣化が有意に改善することが明らかとなった。以上の検討結果より、RBP は C と比較して糖尿病モデルラットのミネラルおよび骨代謝異常の進行を抑制している可能性が示された。

Rice Bran Protein, Diabetes, CKD-MBD

発表責任者：菅木省吾（f15d034k@mail.cc.niigata-u.ac.jp）

講演番号：2A04a06
講演日時：3 月 18 日 10:45～ A 校舎 04 会場

# 米胚乳タンパク質摂取が血清 IgE 濃度に及ぼす影響

# Effect of orally administrated Rice Endosperm Protein(REP) on serum IgE levels

○鎌田 拓也[1]、原 崇[1,2]、久保田 真敏[2]、藤井 幹夫[3]、藤村 忍[1,2]、門脇 基二[1,2] ([1]新潟大院自然科学、[2]新潟大農、[3]（株）亀田製菓)
○ Takuya KAMADA[1], Takashi HARA[1,2], Masatoshi KUBOTA[2], Mikio FUJII[3], Shinobu FUJIMURA[1,2], Motoni KADOWAKI[1,2] ([1]Graduate School, Niigata Univ., [2]Niigata Univ., [3]Kameda Seika Co., Ltd.)

【目的】
米はタンパク質含量が低い(約 6%)こともあり、タンパク質供給源としての価値は軽視されがちである。しかし現在の日本において、米は肉類や魚介類に次ぐ 3 番目のタンパク質供給源である。そこで当研究室ではこの供給源としての重要性に注目し、米胚乳タンパク質(REP)の新規の機能性を探索する研究を行ってきた。現在までに、REP は血漿コレステロール低下や糖尿病性腎症の進行遅延などの効果が明らかとなり、さらに免疫調節作用を示唆する結果が得られつつある。本研究では、IgE 産生に及ぼす REP の影響について、マウスを用いた経口投与試験により検討した。

【方法】
REP は Kumagai らの方法に従い、0.2%NaOH を用いたアルカリ抽出法により調製した[1)]。3 週齢の雌性 BALB/c マウスを REP 投与群と卵白タンパク質（EWP）投与群（対照群）に分け、 22～24℃に維持された環境下で飼育した。飼料は AIN93-G に準じ、各タンパク質精製物を用い、CP20％となるように調製し、給餌した。経時的にマウス尾静脈より末梢血を採取し、血清中の抗体量（IgE, IgG1, IgG2a）を ELISA 法により測定した。

【結果】
飼育開始後 4 週目にかけて、REP 投与群の血清総 IgE 濃度は、EWP 投与群と比較して有意に低い値を示した（$P < 0.05$）。同時に、REP 投与群において EWP 投与群と比べ血清総 IgG1 濃度が有意に低いことが示された（$P < 0.05$）。血清 IgG2a/IgG1 比は REP 投与群の方が高い値で推移した。REP は Th1/Th2 バランスを Th1 側へ偏向させ、IgE 産生抑制作用を有する可能性が推察される。また、サイトカインなどその他の項目に関しては、現在進行中である。

1)Kumagai et al., J Nutr Sci Vitaminol. 2006 Dec;52(6):467-72.

Rice Endosperm Protein, Th1/Th2 balance, IgE

発表責任者：鎌田拓也（tkmd1001@gmail.com）

講演番号：2A04a07
講演日時：3 月 18 日 11:00～ A 校舎 04 会場

緑葉タンパク質の酵素消化物の一斉分析により発見した新しい抗不安様ペプチド
Novel anxiolytic-like peptides found based on comprehensive analysis of enzymatic digest of green leaf proteins

○木村 彩映子[1]、山本 あかね[1]、倉林 篤史[2]、佐藤 大[2]、鈴木 秀幸[2]、金本 龍平[1]、大日向 耕作[1]（[1]京大院農食品生物、[2]かずさ DNA 研究所・バイオ研究開発部）
○Saeko KIMURA[1], Akane YAMAMOTO[1], Atsushi KURABAYASHI[2], Masaru SATO[2], Hideyuki SUZUKI[2], Ryuhei KANAMOTO[1], Kousaku OHINATA[1] ([1]Division of Food Science and Biotechnology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, [2]Department of Research & Development, Kazusa DNA Research Institutes)

【目的】これまで我々は、食品タンパク質の酵素分解により生成するペプチドフラグメントと神経系の相互作用を検討し、精神的ストレス緩和（抗不安様）作用を示すペプチドを見出してきた。本研究では、ほうれん草など緑葉野菜の主要タンパク質である Rubisco に着目した。本タンパク質は、全ての光合成生物に存在し、地球上で最も多く存在するタンパク質として知られる。Rubisco を消化管酵素で分解して得られた消化物を経口投与したところ、ペプシン消化物に抗不安様作用を見出した。さらに消化物を一斉分析し、抗不安様ペプチドを探索した結果、3 種類の新規抗不安様ペプチドを同定した。

【方法】実験動物は ddY 雄性マウスを用いた。ほうれん草から抽出した Rubisco を各種消化管酵素により消化し、得られたサンプルの抗不安様作用を評価した。抗不安様作用は、高架式十字迷路試験およびオープンフィールド試験で評価した。活性が認められた消化物を nanoLC-Orbitrap-MS を用いてペプチド一斉分析を行った。候補ペプチドを化学合成し、抗不安様作用を評価した。

【結果および考察】高架式十字迷路試験において、Rubisco のペプシン消化物をマウスに経口投与したところ、オープンアームでの滞在時間が有意に増加し、抗不安様作用を示すことが判明した。次に、ペプシン消化物に含まれるペプチドを一斉分析し、200 種以上のペプチドを検出した。この中で、既知の抗不安様ペプチドとホモロジーを有するものを探索し、得られた候補ペプチドを化学合成し、高架式十字迷路試験を行った。その結果、3 種類のペプチド SYLPPLTT、YHIEPV、YLLVK が、経口投与により抗不安様作用を示すことを明らかにした。最小有効量は、それぞれ 1 mg/kg、3 mg/kg、0.03 mg/kg と医薬品に匹敵する低用量であった。それぞれのペプチドがペプシン消化物中に存在することを確認し（18.3 mol%、3.8 mol%、1.4 mol%）、rubisco anxiolytic-like peptide (rALP) -1, -2, -3 と命名した。また、最も含量の高い rALP-1 は、オープンフィールド試験においても抗不安様作用を示すことを確認した。さらに、rALP-1 の抗不安様作用は セロトニン $5\text{-HT}_{1A}$ 受容体アンタゴニストの WAY100135 により阻害されたことから、$5\text{-HT}_{1A}$ 受容体の活性化を介すると考えられる。

【結論】緑葉の主要タンパク質 Rubisco のペプシン消化物から、経口投与で有効な 3 種類の新しい抗不安様ペプチド rALP-1, -2, -3 を見出した。

本研究は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業を活用して実施した。

Anxiolytic-like peptide, Rubisco, Pepsin

講演番号：2A04a08
講演日時：3 月 18 日 11:15～ A 校舎 04 会場

# 乳たんぱく質素材の消化性と GLP-1 分泌刺激活性に関する検討

# Protein digestibility and stimulation activity of GLP-1 secretion by milk protein ingredients

○小松 陽介[1,2]、和田 泰明[1,2]、井上 大輔[3]、和泉 裕久[2]、清水 隆司[2]、武田 安弘[2]、比良 徹[3]、原 博[3] ([1]北海道大学産学・地域協働推進機構 FMI 推進本部、[2]森永乳業（株）健康栄養科学研究所、[3]北海道大学農学研究院)

○ Yosuke KOMATSU[1,2], Yasuaki WADA[1,2], Daisuke INOUE[3], Hirohisa IZUMI[2], Takashi SHIMIZU[2], Yasuhiro TAKEDA[2], Tohru HIRA[3], Hiroshi HARA[3] ([1]Center for Food and Medical Innovation Promotion, Institute for the Promotion of Business-Regional Collaboration of Hokkaido University, [2]Morinaga Milk Industry Co.,Ltd., [3]Research Faculty of Agriculture Hokkaido University)

【背景・目的】乳たんぱく質は、アミノ酸バランスの良い優れたたんぱく質素材であり、様々な生理活性を示す。乳たんぱく質はカゼイン(CN)とホエイたんぱく質（WP）に大別され、工業的には CN/WP 比の異なる様々な乳たんぱく質素材が開発されている。一方で、それらの消化性や、消化物が消化管に及ぼす生理作用については、十分な検討がなされていない。本研究では、複数の乳たんぱく質素材について、その消化性の違いと、消化物による消化管ホルモン GLP-1 の分泌刺激活性の違いについて比較を行った。

【方法】乳たんぱく質素材として、全ての乳たんぱく質画分を含んだ Total Milk Protein（TMP)、CN 画分を膜処理によって濃縮した micellar CN（MCN)、CN を酸沈殿して精製した乳酸 CN （lactic casein（LCN))、酸沈殿した CN をアルカリ処理して得た CN ナトリウム（sodium caseinate（SCN))、CN 画分を精製する際に副次的に得られる WP を濃縮した WP 濃縮物（WP concentrate（WPC))、及び WPC をイオン交換処理によって精製した WP 精製物（WP isolate（WPI))について、評価を行った。これらの乳たんぱく質素材について、ヒト消化管内を模した人工消化試験に供し、消化物を作製した。得られた消化物について、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）によってバンドパターンを比較するとともに、ナノ液体クロマトグラフ - 質量分析装置（Orbitrap Elite）を用いて乳たんぱく質由来のペプチド配列の同定を行い、消化性を比較した。また、生理作用の評価として、マウス下部消化管由来の L 細胞株である GLUTag 細胞に、各種素材の人工消化物を処置し、消化管ホルモン GLP-1 の培養上清中の量を ELISA 法により測定した。

【結果】乳たんぱく質素材の消化物の SDS-PAGE におけるバンドパターンを比較した結果、全ての消化物においてスメア状のバンドが検出されたが、TMP と CN 素材の消化物は、WP 素材の消化物と比較してスメア状のバンドが薄く、消化性が良好であった。また、CN 素材の中でも LCN と SCN は、特に消化性が高い素材であると考えられた。ペプチド配列を解析した結果、LCN および SCN の両消化物では、MCN の消化物と比較して、β-ラクトグロブリンとκ-CN に由来するペプチド配列の種類が少なかったことから、各素材に含まれるたんぱく質の種類や量が、消化性の違いを反映しているものと考えられた。GLUTag 細胞を用いた各消化物の GLP-1 分泌刺激活性の比較では、LCN および SCN の両消化物は、GLP-1 分泌を誘導しなかったのに対し、それ以外の消化物は、GLP-1 分泌を有意に亢進させた。

【結論】本検討の結果、製造工程における処理の違いによって、乳たんぱく質の消化性や GLP-1 分泌刺激活性が異なることが示唆された。

milk protein, digestibility, GLP-1

発表責任者：小松陽介（yo-komatsu@morinagamilk.co.jp）

講演番号：2A04a09
講演日時：3 月 18 日 11:30～ A 校舎 04 会場

# アンセリン含有サケエキス摂取によるテニスパフォーマンス向上効果

# Improvement effect of salmon extract containing anserine (SEAns) on tennis performance

○小西 達也[1]、高橋 義宣[1]、椎名 康彦[1]、駒澤 真人[2]、板生 研一[2,4]、平田 盛子[3]、杉山 芙沙子[3,4]
([1]マルハニチロ株式会社、[2]WIN フロンティア株式会社、[3]パーム・インターナショナル・テニス・アカデミー、[4]順天堂大学医学部)
○ Tatsuya KONISHI[1], Yoshinori TAKAHASHI[1], Yasuhiko SHIINA[1], Makoto KOMAZAWA[2], Kenichi ITAO[2,4], Shigeko HIRATA[3], Fusako SUGIYAMA[3,4] ([1]Maruha Nichiro Corporation, [2]WINFrontier Co., Ltd., [3]Palm International Tennis Academy, [4]Jyuntendo Univ.)

【背景・目的】

アンセリンやカルノシンは、その構造からイミダゾールジペプチドと総称されている。これらは脊椎動物の筋肉や脳に存在し、特にサケやカツオのような回遊魚や渡り鳥など、持久力や瞬発力を必要とする動物の筋肉に多いことから、抗疲労素材として注目されている。我々は、サケ肉を原料としてアンセリンを豊富に含むサケエキス（SEAns）を開発し、これまでに運動時の疲労低減効果、眼精疲労および老視改善効果、脂肪蓄積抑制効果などの生理機能を明らかにしてきた。本研究では、SEAns 摂取による運動疲労低減に及ぼす効果を、テニスによるパフォーマンス評価や心拍数等の生体センサを用いた評価で検証した。

【方法】

被験者は、日常的にテニスを行う健常な男女 14 名（20.7±0.7 歳）とし、SEAns（アンセリンとして 400 mg/日）を含むゼリー、もしくは含まないゼリー（プラセボ食）を 2 週間摂取した時のテニスのパフォーマンスに与える影響を、プラセボ対照二重盲検比較試験にて実施した。運動負荷は、30 秒間、一定間隔でコートの左右に球出しを行い、その後 20 秒間休憩するサイクルを 4 回行った。これを 1 セットとし、1 セット終了毎に 5 分間の休憩を挟んで合計 3 セット行った。返球側のコートを 4 区画に分けて返球精度を得点化し、被験者には高得点を取るよう指示した。評価は、返球スコアおよび生体センサ（脈波センサおよび心拍センサ）による心拍変動解析より検証した。

【結果および考察】

返球精度を反映したスコア評価において、SEAns 摂取群ではプラセボ摂取群と比較して有意な高得点であった。さらに、生体センサ解析では、平均心拍数が運動 3 セット目終了後においてプラセボ摂取群に比べて SEAns 摂取群は有意に低かった。これらの結果から、SEAns の摂取により心拍数の上昇が抑制され、運動パフォーマンスが向上したと考えられた。

以上より、SEAns は疲労を低減し、運動機能を向上する食品素材として、幅広い利用が期待できる。

tennis performance, salmon extract containing anserine, anti-fatigue

発表責任者：小西 達也（t-konishi@maruha-nichiro.co.jp）

講演番号：2A04p01
講演日時：3 月 18 日 14:00～ A 校舎 04 会場

小角散乱法で見るグリアジン水和凝集体のナノ構造に及ぼす食塩添加効果
Salt effect on nano-structure of gliadin hydrates as revealed by small-angle scattering
○佐藤 信浩[1]、大場 洋次郎[1]、井上 倫太郎[1]、杉山 正明[1]、東野 ゆうき[2]、裏出 令子[2] ([1]京大原子炉、[2]京大院農)
○Nobuhiro SATO[1], Yojiro OBA[1], Rintaro INOUE[1], Masaaki SUGIYAMA[1], Yuki HIGASHINO[2], Reiko URADE[2] ([1]Research Reactor Institute, Kyoto Univ., [2]Graduate School of Agriculture, Kyoto Univ.)

【目的】コムギタンパク質グリアジンは、小麦粉生地の物性のうち主に粘性的な挙動に影響を及ぼす。食塩の添加によってグリアジンの物性は大きく変化するが、食塩添加に伴う物性変化が凝集体中のグリアジン分子間の相互作用の変化とどのように関連するかは未だ解明されていない。我々はこれまで純水中に抽出されたグリアジンの水溶液および水和凝集体について X 線小角散乱法（SAXS）によるナノ構造解析を行い、孤立分子のサイズや形状、あるいは凝集体の凝集構造について明らかにしてきた。その結果、グリアジン水和凝集体において系中に存在する不均一性に起因する密度ゆらぎが、濃度変化によって大きく変化することを見いだしている。そこで、本研究では、グリアジン水和凝集体のナノ構造に及ぼす食塩添加効果に着目し、SAXS、超小角 X 線散乱法（USAXS）ならびに中性子小角散乱法（USANS）を用いて、食塩の添加量や温度変化に伴う 30–1,000 nm スケールにおける構造の相違を調べた。
【方法】グリアジンは既報[1]に従って調製した。グリアジンの濃度範囲は 15–70%とし、添加する食塩濃度は 0-3 M とした。SAXS 測定は高エネルギー加速器研究機構フォトンファクトリーのビームライン BL-10C（測定 $q$ 範囲 0.06-2.5 $nm^{-1}$）、USAXS 測定は SPring-8 のビームライン BL19B2（測定 $q$ 範囲 0.005-0.2 $nm^{-1}$）をそれぞれ用い、いずれも室温で測定した。SANS 測定は、オーストラリア原子力科学技術機構の小角散乱ビームライン Quokka（測定 $q$ 範囲 0.007-5 $nm^{-1}$）において、温度 26 – 66℃の範囲で実施した。
【結果】40%のグリアジンは流動性を伴ったペースト状の水和凝集体であるが、食塩量の増加とともに離水し、より凝縮した性状の固体へと変化する。このとき、$q$ = 0.3 – 1 $nm^{-1}$ の中高角領域で観測される、グリアジン凝集体内部の密度ゆらぎに基づくブロードなピークは、徐々に高角側にシフトするとともにピーク強度が小さくなっていく。この変化は、食塩を添加せずグリアジン濃度を増加させた場合の変化と類似しており、凝集構造がより緻密になり、内部の不均一性が減少していくことを示している。一方、0.03 – 0.07 $nm^{-1}$ 付近の超小角領域においては食塩添加による新たな相関ピークの出現が見られることから、より大きな凝集構造における不均一構造が食塩添加によって誘起されていることが示唆された。一方、SANS による温度変化測定の結果は、食塩濃度が高いほど温度変化に伴う散乱曲線の変化が大きくなっており、食塩の凝集作用によって形成される構造が温度変化に強く影響を受けることが明らかとなった。

1) N. Sato *et al.*, *J. Agric. Food. Chem.*, **63**, 8715 (2015).

gliadin, SAXS, SANS

発表責任者：佐藤信浩（sato-n@rri.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A04p02
講演日時：3 月 18 日 14:15～ A 校舎 04 会場

グリアジン水和凝集体のナノスケール構造形成におけるグルタミン残基の役割
Role of glutamine residues in formation of nano-structure of gliadin hydrates
○久保田 秀人[1]、佐藤 信博[2]、杉山 正明[2]、井上 倫太郎[2]、東野 ゆうき[1]、裏出 令子[1]([1]京大院農・農学、[2]京大原子炉)
○ Shuto KUBOTA[1], Nobuhiro SATO[2], Masaaki SUGIYAMA[2], Rintaro INOUE[2], Yuki HIGASHINO[1], Reiko URADE[1] ([1]Kyoto Univ., Division of Agronomy and Horticultural Science, [2]Kyoto Univ., Research Reactor Institute)

**【目的】**コムギタンパク質グリアジンの水和凝集体がもつ独特の物性は、グリアジン分子の凝集体構造にその源がある。われわれは、量子線小角散乱解析により、グリアジン分子が寄り集まってナノスケールの小さな凝集体を形成し、それらがさらに集合してより大きなスケールの凝集体を形成する階層的な構造を持つことを明らかにしてきた。このような凝集体構造は、分子間の水素結合や疎水性相互作用などの非共有的な結合により形成されている。特に、主要グリアジンのアミノ酸残基の約 40～50%を占めるグルタミンが関わる分子間相互作用が構造形成に重要であると考えられる。本研究では、グルタミンが凝集体構造形成に果たしている役割を明らかにすることを目的に、グルタミン残基の脱アミド化がナノスケール構造に及ぼす影響を X 線小角散乱解析(SAXS)により検討した。
**【方法】**グリアジンは、食塩添加生地を純水でもみ洗いする方法で抽出した。10%グリアジン水溶液に天野エンザイムから供与されたプロテイングルタミナーゼを添加し、インキュベーションすることで脱アミド化を行った。脱アミド化の程度は二次元電気泳動などで検証した。純水あるいは NaCl 溶液を用いて作製した 40%グリアジン水和物を室温で Cu 線源 X 線小角散乱装置 NANOPIX (波長 0.154 nm, 測定 q 範囲 0.02-40 $nm^{-1}$) に供し、散乱プロファイルを得た。**【結果・考察】**グリアジンはプロテイングルタミナーゼにより経時的に脱アミド化が進行し、それに伴って等電点がアルカリ性(pI=～8)から酸性にシフトするとともに SDS-PAGE 上での見かけの分子サイズが増加した。脱アミド化処理を 7 時間以上行うとすべてのグリアジン分子種の pI が 4～4.5 となり、それ以上の変化は見られなかった。未処理グリアジンと 24 時間脱アミド化したグリアジン間で SAXS のプロファイルに大きな差はなく、両方ともナノスケールの小さな集合体の形成と、その集合体間距離が約 14 nm であることを示す q 値でピークが観察された。このことから、凝集体の基本単位となる小さなグリアジン集合体の形成にはグルタミン残基がほとんど関わっていない可能性が示唆された。一方、凝集体構造への NaCl の影響は脱アミド化処理によって大きく変化した。すなわち、未処理グリアジンでは NaCl 濃度が高くなるにしたがって散乱プロファイルのピークの q 値が広角側にシフトするとともに形が鈍化するのに対して、脱アミド化処理グリアジンではピークのシフトと形の鈍化がほとんど起こらなかった。この結果は、未処理グリアジンの場合は NaCl の存在下で小さなグリアジン集合体間で分子間相互作用が増加し全体がコンパクトに凝集するが、脱アミド化処理グリアジンでは分子間相互作用が増加しないことを示しており、この相互作用にグルタミン残基が大きく関わっていることが明らかとなった。

Gliadin, Deamidation, SAXS

発表責任者：久保田秀人（kubota.shuto.22m@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A04p03
講演日時：3 月 18 日 14:30～ A 校舎 04 会場

# 大豆形質転換体を用いて作成した組み換え型小麦γ-グリアジンの解析

# Analysis of recombinant wheat γ-gliadin produced by transgenic soybean

○松岡 祐樹[1]、奥田 英子[1]、山田 哲也[2]、裏出 令子[1]、丸山 伸之[1] ([1]京大農、[2]北大農)
○ Yuki MATSUOKA[1], Eiko OKUDA[1], Tetsuya YAMADA[2], Reiko URADE[1], Nobuyuki MARUYAMA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Hokkaido Univ.)

【目的】小麦粉から調製されるグルテンはグリアジンとグルテニンより構成されており、それらのタンパク質構造により特有の食品物性を示す。グルテン構成タンパク質の高次構造と食品物性との相関を詳細に解析するためには純度の高い精製標品が必要であるが、小麦にはグルテン構成タンパク質に対する多くの分子種が含まれるため、単一の分子種を精製することが非常に難しい。そのため、異種細胞発現系による組換えタンパク質の調製法の確立が望まれている。本研究では、ダイズ種子にγ-グリアジンを発現させた形質転換体を作製し、組換え型γ-グリアジンのタンパク質化学的性質を解析することを計画した。
【方法】1) ダイズ早生品種であるカリユタカを用いたアグロバクテリウムによる形質転換法により[1)]、γ-グリアジンに対する発現用ベクターを構築して、形質転換を行った。アグロバクテリウム感染後、選抜によって形質転換体を得た。2) ウサギを宿主動物としてγ-グリアジンに対する免疫処理を行い、抗γ-グリアジン血清を調製した。3) SDS を含む緩衝液を用いて形質転換体種子からタンパク質を抽出し、抗γ-グリアジン血清に対するウェスタンブロット解析を行った。4) 形質転換体種子を固定後、樹脂に包埋し、電子顕微鏡による細胞内構造の形態観察を行うとともに、抗血清を用いてγ-グリアジンの局在を解析した。5) 70%エタノール，50%プロパノール，リン酸緩衝液などの溶媒を用いて、形質転換体種子より抽出した。
【結果】形質転換種子を用いた抗γ-グリアジン血清によるウェスタンブロット解析において、約 30k Da 付近にバンドが検出されたことから、γ-グリアジンが種子に安定に蓄積していることが示された。また、免疫電子顕微鏡観察による形質転換体の種子細胞におけるγ-グリアジンの局在性の解析から、特徴的な形態をもつ構造体にγ-グリアジンが局在していることが示唆された。各種溶媒に対する抽出液に対して、抗γ-グリアジン血清によりウェスタンブロット解析を行ったところ、70%エタノールおよび 50%プロパノールではγ-グリアジンが抽出されたが、リン酸緩衝液ではほとんど抽出されなかった。さらに、抽出された条件をもとに、組換え型γ-グリアジンの精製を進めている。

・本研究において京都大学生存圏研究所・生態学研究センターDASH システムを利用した。

Reference

1) Yamada et al., Plant Biotechnology 27:217-220.

gluten, gliadin, transgenic soybean

講演番号：2A04p04
講演日時：3 月 18 日 14:45～ A 校舎 04 会場

# ε-ポリリシンおよびデキストランとの複合体化による大豆β-コングリシニンの機能改変

Functional Improvement in ß-conglycinin by Conjugation with ε-polylysine and dextran

○松本 拓也、橋本 健史、服部 誠、好田 正（農工大農）
○Takuya MATSUMOTO, Takeshi HASHIMOTO, Makoto HATTORI, Tadashi YOSHIDA (Tokyo Noko Univ.)

【目的】大豆タンパク質の主成分であるβ-コングリシニンは必須アミノ酸を豊富に含む良質のタンパク質であり、乳化性・気泡性・ゲル化性などの機能特性や、血中コレステロール低下作用、血圧上昇抑制などの生理機能を持つ有用な食品素材である。一方で、このタンパク質は酸性条件下で機能特性が低下するため、食品の調理・加工・保存における大豆タンパク質の利用の障害となっている。また、大豆アレルギーの原因物質であることが問題となっている。本研究では、トランスグルタミナーゼ（MTGase）により、β-コングリシニンとε-ポリリシン（PL）を複合体化させ、さらにメイラード反応によりデキストラン(Dex)を結合させることにより、β-コングリシニンの機能特性の向上と低アレルゲン化を達成することを目的としている。
【方法】β-コングリシニンは、等電点沈殿と陰イオン交換クロマトグラフィーにより、脱脂大豆粉末から抽出・精製した。精製β-コングリシニンの Gln 残基と PL のε-アミノ基のモル比が 1：1 となるように混合し、タンパク質溶液とした。１ｇのタンパク質に対して 200 unit の酵素力値となるように、タンパク質溶液と酵素溶液を混合した。pH 7.6、40℃で１時間 MTGase 反応させ、β-コングリシニン-PL 複合体を得た。アミノ酸分析により複合体の化学組成を調べた。さらに、β-コングリシニン-PL 複合体と Dex(分子量 9,000-11,000)を重量比 1:3 で混合し、相対湿度 79%、60℃で 48 時間メイラード反応を行い、β-コングリシニン-PL-Dex 複合体を得た。複合体を SDS-PAGE に供し、CBB 染色および PAS 染色を行うことにより、複合体化を確認した。機能の評価として、β-コングリシニン-PL 複合体の乳化性測定、免疫原性の評価を行った。乳化性は異なる pH に対して濁度法により評価した。免疫原性は複合体を BALB/c マウスに腹腔内投与により免疫し、得られた抗血清を用いて非競合法 ELISA を行うことによって特異的抗体量を測定した。
【結果】MTGase 反応により、高分子のβ-コングリシニン-PL 複合体が得られた。アミノ酸分析により、β-コングリシニン１分子あたり約 18 分子の PL が結合していることが明らかとなった。また、メイラード反応によりβ-コングリシニン-PL-Dex 複合体が得られた。β-コングリシニン-PL 複合体の乳化性測定を行ったところ、酸性条件下と塩存在下での乳化性の改善が認められた。これは PL の結合による親水基の付与、強い正電荷の付与により界面が安定化したと考えられた。さらに免疫原性の評価を行ったところ、複合体化による免疫原性の低下を認めた。以上より、本研究の手法がβ-コングリシニンの溶解性、乳化性、免疫原性といった機能性の改善に有効であることが明らかとなった。

be-ta conglycinin, protein conjugation, functional improvement

発表責任者：松本拓也（takuya.m.0709@gmail.com）

講演番号：2A04p05
講演日時：3 月 18 日 15:00～ A 校舎 04 会場

ダイズ加工食品の鉄成分に対するフェリチンの寄与
Contribution of Ferritin to the Iron Content of Soy-derived Foods
○増田 太郎[1]、後藤 文之[2]、吉原 利一[2] ([1]京大農、[2]電中研)
○Taro MASUDA[1], Fumiyuki Gotoh[2], Toshihiro Yoshihara[2] ([1]Kyoto Univ., [2]CRIEPI)

【背景・目的】鉄は全ての生物にとって生育に必須な遷移金属元素であり、人体にとって最も不足しやすい微量栄養素である。ダイズは植物由来の食品素材の中で、鉄含有量が高く、人体にとって良好な鉄給源として期待される。ダイズ種子における鉄の大半は、球状の多量体を形成する鉄貯蔵蛋白質・フェリチンに内包されている。本研究では、ダイズ種子形成時のフェリチン遺伝子の発現、蛋白質の蓄積について検討し、更に、ダイズ種子の食品加工時における鉄分の推移とフェリチンの動態を明らかにすることを目的とする。
【実験方法】実験室における豆腐の調製にはダイズ（品種・トヨマサリ）乾燥種子を用いた。大豆種子、および各食品（豆乳、豆腐、薄揚げ、納豆、味噌）の鉄成分は、各乾燥試料を濃硝酸と過酸化水素によりを灰化した後、原子吸光法により定量した。ダイズフェリチンの検出は、SDS-PAGE 後 CBB 染色、若しくは、ダイズフェリチン特異的抗体を用いたイムノブロットにより行った。種子、および食品からのフェリチンの精製は塩析と各種のクロマトグラフィーにより行い、フェリチンの会合状態はサイズ排除クロマトグラフィーにより推定した。蛋白質の熱変性温度は、試料昇温に伴う円二色性スペクトルの 222nm におけるモル楕円率の変化をプロットし、算出した。
【結果】4 種あるダイズフェリチン遺伝子のうち、sfer1 はダイズ種子形成期の全体を通じて強く発現しており、種子形成初期には sfer1 に加えて sfer2 の活発な発現が確認された。フェリチン蛋白質の種子への蓄積も、主として種子形成初期に認められ、乾燥種子に存在するフェリチンは SFER1 と 2 サブユニットからなるヘテロ多量体であった。ダイズ加工食品の鉄含有量は、乾燥重量 100g あたり、6-10mg となり、植物由来の食品としては相対的に高い値を示した。フェリチンは、豆乳、豆腐、薄揚げにおいて検出されたが、納豆、味噌といった発酵食品では検出されなかった。更に、煮沸などの加熱を伴う食品加工過程において、フェリチンが従来の多量体構造を維持し多量の鉄を保持し得るかを検討するため、豆腐からフェリチンを精製し、その会合状態と鉄保持量を求めた。その結果、フェリチンは乾燥種子中と同様、豆腐においても 24 量体を形成しており、24 量体一分子あたり約 300 から 500 の鉄原子を保持していた。本研究の結果から、フェリチンは加熱を伴う調理過程でも多量体構造を維持し、ダイズ加工食品中の鉄分の保持に寄与することが明らかとなった。
Taro Masuda (2015) Soybean Ferritin Forms an Iron-Containing Oligomer in Tofu Even after Heat Treatment. J. Agric. Food. Chem. 63(40):8890-8895

Iron, Ferritin, Soybean

発表責任者：増田太郎（masutaro@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A04p06
講演日時：3 月 18 日 15:25～ A 校舎 04 会場

米アルブミンの二次機能特性と熱耐性
Secondary function and thermostability of rice albumin
○濱田 彩[1]、戸原 隆吉[1]、西田 祥子[1]、秋間 彩香[3]、稲 成信[2]、赤尾 真[1,2]、熊谷 仁[3]、熊谷 日登美[1,2] ([1]日大生資科、[2]日大院生資科、[3]共立女子家政)
○Aya HAMADA[1], Takayoshi TOHARA[1], Shachiko NISHIDA[1], Ayaka AKIMA[3], Shigenobu INA[2], Makoto AKAO[1,2], Hitoshi KUMAGAI[3], Hitomi KUMAGAI[1,2] ([1]Nihon Univ., [2]Grad Sch. Nihon Univ., [3]Kyoritsu Women's Univ.)

【目的】タンパク質には，様々な生体調節機能特性を有するものが知られているが，その一方で，一般的に，加熱により変性し沈殿になりやすく，乳化性や起泡性といった嗜好性に関連する二次機能特性も種類によって大きく異なるため，加工・製造工程において扱いづらいとされている。当研究室では，水溶性タンパク質である米アルブミンが，難消化性であり食物繊維様のグルコース吸着性を示し，食後グルコース血糖値上昇を抑制することを報告した。しかし，米アルブミンの加熱安定性や二次機能特性は不明である。本研究では，米アルブミンの産業利用に向け，起泡性，乳化性などの機能性の検討を行なった。また，加熱を伴う製造工程への利用を考え，米アルブミンの熱安定性についての検討も行った。
【方法】米粒を粉砕後，pH 6.0 の緩衝液でタンパク質を抽出し硫安分画によりアルブミン画分を分離した。これを透析し凍結乾燥により米アルブミン粉末を得た。乳化性はタンパク質溶液とコーン油をホモジナイズし，得られた溶液の濁度より求めた。起泡性はタンパク質溶液中に窒素ガスを送気することにより発生した起泡体積から評価した。乳化性と起泡性の試験には，米アルブミンの他に，比較対象として，機能特性の良く知られているカゼイン，大豆タンパク質，乾燥卵白を用いた。また，食品加工における種々の pH 環境下での使用を想定し，試験溶媒として pH 3-8 の緩衝液を用いた。タンパク質の熱安定性の検討は，示差走査熱量測定（Differential scanning calorimetry: DSC）により行った。DSC 測定に関しては，0.1%米アルブミン溶液をアルミニウム pan に入れ，昇温速度 1℃/min で室温から 125℃まで昇温した。Reference には水の入ったアルミニウム pan を用いた。DSC 測定は，米アルブミン溶液と 121℃で 20 分加熱した試料についても行った。
【結果】米アルブミンは，乳化力の高いカゼインと同程度の乳化性を示し，カゼインが等電点付近の pH 4-5 付近において乳化性が低下したのに対し，米アルブミンは全ての pH において高い乳化性を示した。さらに，米アルブミンは起泡性の高い乾燥卵白と同程度の起泡性を示した。DSC 測定において，60℃～80℃の範囲で熱変性に伴うと考えられる吸熱ピークが観察された。しかし，その吸熱ピークは，121℃で加熱した試料についても観察された。このことから，60℃～80℃で起こる熱変性は，可逆的であることが確認できた。これは，米アルブミン中の S-S 結合により，加熱に伴う不可逆的なタンパク質の高次構造変化が起こりにくいためと推察される。以上から，米アルブミンは，優れた機能性を有し，耐熱性も高く，加熱工程を含む製造にも適した素材となりうることが示唆された。

Rice protein, Secondary function, Thermostability

発表責任者：熊谷　日登美（kumagai@brs.nihon-u.ac.jp）

講演番号：2A04p07
講演日時：3 月 18 日 15:40～ A 校舎 04 会場

# 鶏卵貯蔵中における ovalbumin-related protein X の構造変化

# Structural modification of chicken ovalbumin-related protein X during egg storage

○赤澤 隆志[1]、野々村 直樹[2]、小川 雅廣[2]、早川 茂[2] ([1]愛媛大院連合農、[2]香川大農)
○Takashi AKAZAWA[1], Naoki NONOMURA[2], Masahiro OGAWA[2], Shigeru HAYAKAWA[2] ([1]Ehime Univ., [2]Kagawa Univ.)

【目的】

鶏卵白に、オボアルブミンのアミノ酸配列と 61%の相同性を持つタンパク質 ovalbumin-related protein X（OVAX）が存在する。OVAX の生理機能は不明であるが、ヘパリンと強く結合することが報告されていることから、OVAX はヘパリンを介した生理機能があることが予測される。我々は卵白中に、ヘパリン結合力が異なる複数の OVAX が存在していることを明らかにした。また、卵を貯蔵すると、OVAX のヘパリン結合力が経時的に弱まっていくことを報告した。（2015 年度岡山大会）。この OVAX のヘパリン結合力の変化は、無精卵だけでなく、有精卵の胚発生中においても起きたことから、ヘパリンの胚発生における役割に OVAX は何らかの関与をすることが推測される。そこで本研究では OVAX のヘパリン結合力の違いと OVAX の構造との関係を調べた。

【方法および結果】

放卵して約 4 時間の無精卵から卵白を分離した。卵白タンパク質をヘパリン結合樹脂（Heparin sepharose）に吸着させ、非吸着タンパク質を洗い流した後、ヘパリン結合タンパク質を 0.05~0.6 M NaCl 溶液でグラジエント溶出させた。その結果、NaCl 濃度 0.17、0.36、0.44、0.55 M の位置に 4 つのピークが現れ、すべてのピーク画分に OVAX が含まれていた。各ピークの OVAX を塩濃度の低い方から、$OVAX_1$、$OVAX_2$、$OVAX_3$、$OVAX_4$ とした。ヘパリン結合力が異なる $OVAX_2$ と $OVAX_4$ の構造特性を調べた。遊離アミノ基、熱変性温度（73℃）、ゲルろ過クロマトグラフィーによって調べた分子の大きさは、両者に違いはなかった。また $OVAX_4$ のトリプトファン蛍光スペクトル（Ex: 295 nm）は、$OVAX_2$ のスペクトルとほぼ同じだった（$\lambda_{max}$ = 340 nm）。しかし、CD スペクトルによる二次構造予測では、$OVAX_2$ の α-helix 含量が $OVAX_4$ よりも 3%低かった。

【考察】

OVAX とヘパリンの結合は、OVAX の分子表面上に存在する陽イオンクラスターとヘパリンの陰イオンとの相互作用で起きると報告されており（Réhault-Godbert *et al.*, 2013）、陽イオンクラスターの一部は α-helix を形成している。よって、卵貯蔵中に起きる OVAX のヘパリン結合力の低下は、陽イオンクラスター内の α-helix のアンフォールディングによって起きることが示唆された。以上のことから、OVAX の α-helix の変化が、ヘパリンの機能の調節に関わっていることが推察された。

egg white protein, ovalbumin, heparin

発表責任者：赤澤隆志（6742001k@stu.kagawa-u.ac.jp）

講演番号：2A04p08
講演日時：3 月 18 日 15:55～ A 校舎 04 会場

# ペクチンとの複合体化による β - ラクトグロブリンの機能改変

# Functional Improvements in Beta-lactoglobulin by Conjugation with Pectin

○小田島 知未、好田 正、服部 誠（東農工大農）
○Tomomi ODASHIMA, Tadashi YOSHIDA, Makoto HATTORI (Tokyo University of Agriculture and Technology)

【目的】

β-ラクトグロブリン（BLG）は乳清タンパク質の約半量を占めるタンパク質である。BLG は栄養学的に優れ，乳化性，ゲル化性，気泡性などの機能特性をもち，食品素材として有用なタンパク質である。しかし，BLG は牛乳アレルギーの主な原因物質であることや，酸性条件下および塩存在下では乳化性が著しく低下してしまうなどの欠点もある。本研究では，食品応用可能なメイラード反応によって BLG にエステル化度の異なる 2 種類のペクチン（LMP，HMP）を複合体化することにより，BLG の乳化性などの機能特性を改善することならびに低アレルゲン化を達成することを目的とした。

【方法】

BLG のアミノ基と LMP あるいは HMP の還元末端のモル比が 1：5 となるように蒸留水に溶解させたものを凍結乾燥し，60 ℃，相対湿度 79 %で 5 日間，メイラード反応させることで，BLG-LMP 複合体，BLG-HMP 複合体を調製した。複合体は透析した後，陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。複合体化の確認は SDS-PAGE により行い，糖化度の測定は OPA 法による遊離アミノ基の定量によって行った。複合体化による BLG の等電点の変化を調べるために等電点電気泳動を行い，複合体の乳化性は濁度法を用いて，乳化活性と乳化安定性を評価した。現在 BALB/c マウスを用いた免疫原性試験を行っており，今後複合体化による免疫原性も評価する。

【結果】

メイラード反応により，異なる分子量帯の複合体が混合した BLG-LMP 複合体，BLG-HMP 複合体が得られた。OPA 法の結果，平均して BLG-LMP 複合体は BLG：LMP＝1：3.0，BLG-HMP 複合体は BLG：HMP＝1：6.3 の比率で糖化していた。また，複合体化によって BLG の等電点は酸性側にシフトした。BLG-LMP 複合体，BLG-HMP 複合体の乳化性は BLG と比較して向上し，特に BLG-LMP での向上は著しく，塩存在下では BLG-HMP 複合体よりも乳化安定性に優れていた。BLG とペクチンの混合溶液では乳化性は変化を示さなかったことから，BLG は複合体化によって乳化性が向上したことが明らかとなった。

β-lactoglobulin, protein conjugation, pectin

講演番号：2A04p09
講演日時：3 月 18 日 16:10～ A 校舎 04 会場

# 可食性バイオハイブリッド創出による β-ラクトグロブリンの高機能化

# Functional improvements in β-lactoglobulin (BLG) by preparing edible bioconjugate

○池田 理沙、堀内 建吾、川合 伸也、好田 正、服部 誠（東農工大農）
○Risa IKEDA, Kengo HORIUCHI, Shinya KAWAI, Tadashi YOSHIDA, Makoto HATTORI (Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

[目的] 主要な乳清タンパク質であるβ-ラクトグロブリン（BLG）は、必須アミノ酸をバランスよく含んだ栄養学的に優れたタンパク質であり、乳化性、気泡性、ゲル化性といった機能特性や、レチノール、脂肪酸、有用疎水性生理活性物質との結合能を有する、潜在的に有用な食品素材である。しかし BLG は、酸性側及び塩存在下では乳化性が著しく低下することや、牛乳アレルギーの最も強力なアレルゲンとなることが問題となっている。本研究では、実際の食品に応用可能な、メイラード反応ならびにトランスグルタミナーゼを用いた酵素反応を組み合わせた手法で、BLG とデキストラン（Dex）、ε-ポリリシン（ε-PL）を複合体化し、BLG の機能改変を達成することを目的としている。
[方法] BLG：PL=1：3（モル比）、MTGase 2000 U /g protein、pH 7.0、 37 ℃の条件で反応させ、BLG-PL 複合体を調製した。さらに BLG-PL を、BLG-PL : Dex＝1 : 5（モル比）、相対湿度 79 %、50 ℃、24 時間の条件でメイラード反応させ、BLG-PL-Dex 複合体を調製した。各複合体は陽イオン交換クロマトグラフィーにより精製し、SDS-PAGE により複合体生成を確認した。得られた複合体の乳化性を濁度法により評価した。複合体の免疫原性を調べるため 3 系統の近交系マウス(BALB/c、C57BL/6、C3H/He)に BLG 複合体を免疫し、非競合法 ELISA によって抗血清中の抗体を検出した。さらに、複合体の抗菌活性を調べるため大腸菌を用いて、各複合体を含んだ液体培地中での増殖を調べた。
[結果] トランスグルタミナーゼを用いた酵素反応によって BLG-PL 複合体が、さらにメイラード反応によって BLG-PL-Dex 複合体が得られた。BLG と比べ、BLG 複合体の酸性 pH 領域ならびに塩存在下の乳化性が向上した。また、複合体化することにより BLG の免疫原性は低下した。BLG-PL 複合体を含む液体培地では細菌の成長が抑制されており、PL の抗菌性が BLG に付与されたことが明らかとなった。本研究は、材料と方法共に食品への応用が可能な方法をとっており、得られた複合体は食品素材として極めて有用であると考えられた。

β-lactoglobulin, protein conjugation, functional improvement

講演番号：2A04p10
講演日時：3 月 18 日 16:25～ A 校舎 04 会場

甘味タンパク質ソーマチンの甘味発現機構
Elicitation sweetness of sweet taste protein thaumatin
○光本 麻佑子、大久保 喬平、三上 文三、谷 史人、桝田 哲哉（京大農）
○Mayuko MITSUMOTO, Kyohei OKUBO, Bunzo MIKAMI, Fumito TANI, Tetsuya MASUDA (Kyoto Univ.)

【目的】精製されたタンパク質は無味無臭であるが、例外的に甘味を呈するタンパク質が存在する。ソーマチンの甘味閾値は 50 nM であり、ショ糖に比べモル比で 10 万倍と非常に強い甘味を呈する。これまでのソーマチン部位特異的変異体に対する甘味活性評価の結果から、クレフト面に存在する塩基性アミノ酸残基が甘味発現に重要な役割を果たすこと、中でも K67、R82 が重要な役割を果たすことが明らかとなっている（１，２）。また 21 位のアスパラギン酸（D21）をアスパラギンに置換することにより、ソーマチンの甘味度を強化することに成功している（３）。ソーマチンと甘味受容体とのドッキングモデルから甘味に重要な K67 および R82 は甘味受容体の酸性アミノ酸残基と相互作用し、またその他のアミノ酸残基も電荷を介して受容体と相互作用している可能性が示唆されている。
本研究では、相互作用に関わる可能性のあるアミノ酸残基に変異を導入し、ソーマチンの甘味発現機構及び甘味度強化機構の詳細を明らかにすることを目的とした。
【方法】受容体との相互作用に関わると考えられる K78、K137 についてアラニンに置換した変異体の作製を試みた。変異体の発現は酵母 *Pichia pastoris* を用い、培養上清を透析後、陽イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。甘味強度は三点識別法を用いたヒト官能検査により評価した。また X 線結晶構造解析を行い変異導入に伴う構造変化の有無について検討した。結晶化は蒸気拡散法にて行い、回折データの収集は大型放射光施設 SPring-8 にて行った。また D21 および K67 近傍に存在する Y57 に着目し、変異体を複数作製した。
【結果】K78A、K137A 変異体の甘味閾値はリコンビナントソーマチンに比べ 4～5 倍程度増加していた。また K78A、K137A 変異体については、分解能 1.07 および 1.01Å のデータを取得できた。現在 K78A、K137A 変異体の構造の精密化ならびに Y57 の変異体について検討を行っている。

（１）Ohta, K., Masuda, T., Ide, N. & Kitabatake, N., *FEBS J.* **275**, 3644–3652 (2008).
（２）Ohta, K., Masuda, T., Tani, F. & Kitabatake, N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* **413**, 41–45 (2011).
（３）Masuda, T., Ohta, K., Ojiro, N., Murata, K., Mikami, B., Tani, F., Temussi, P.A. & Kitabatake, N. *Sci. Rep*., **6**, 20225 (2016).

sweet, electrostatic potential, sensory analysis

発表責任者：光本麻佑子（mitsumoto.mayuko.76z@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A04p11
講演日時：3 月 18 日 16:50～ A 校舎 04 会場

豆味噌におけるコク寄与成分の解析
The analysis of the components that contribute to the *koku* attribute in soy miso (*mame miso*)
○井上 裕[1,2]、佐治 明歩[1]、勝又 忠与次[2]、渡辺 寛人[1]、早瀬 文孝[1] ([1]明治大農、[2]MC フードスペシャリティーズ株式会社)
○Yutaka INOUE[1,2], Akiho SAJI[1], Tadayoshi KATSUMATA[2], Hirohito WATANABE[1], Fumitaka HAYASE[1] ([1]Meiji Univ., [2]MC Food Specialties Inc.)

【目的】
豆味噌は調理食品のコクの付与に用いられることが多い味噌であり、当研究室では本学会にて豆味噌の高分子画分（3-5kDa、5-10kDa）がコクの感覚の 1 つである「厚み」に寄与していることを報告した[1)]。豆味噌はその特異な製造方法により、熟成時に米味噌よりも酵母による発酵を抑え、メイラード反応を促進しているため、メイラード反応生成物であり既知のコク寄与成分であるメラノイジン[2)]およびメイラードペプチド[3)]が含まれていることが推測された。そこで、本研究は豆味噌の高分子画分におけるメラノイジンおよびメイラードペプチドの含有量の測定を行い、「厚み」への寄与について検討を行った。
【実験方法】
豆味噌の水溶性画分から限外濾過により、3-5kDa、5-10kDa、10kDa 以上の 3 種の高分子画分を取得した。次にケルダール法による全窒素分析と酸分解法によるアミノ酸分析からメラノイジン含有量を、メイラードペプチド含有量として LC/MS/UV を用いたフロシン分析からグルコース結合ペプチド含有量を測定した。比較のため、淡色系辛口米味噌および赤色系辛口米味噌についても同様に測定した。また豆味噌における各成分のコクへの寄与を確認するため、グルコースとグルタミン酸の加熱反応から得たモデルメラノイジン、およびグルコースと大豆ペプチドの加熱反応から得たモデルメイラードペプチドをそれぞれ「豆味噌低分子画分（3kDa 以下）を加えたうま味溶液」に添加し、無添加溶液をコントロールとして、7 段階評価尺度法にて「厚み」について評価を行った。
【結果・考察】
成分分析の結果、豆味噌の 3 種の高分子画分にメラノイジンおよびグルコース結合ペプチドが含まれていることが確認され、豆味噌は他の米味噌と比べ、味噌あたりの 3-5kDa、5-10kDa、10kDa 以上のメラノイジン含有量および 3-5kDa、5-10kDa のグルコース結合ペプチド含有量が多いことが確認された。また官能評価より、メラノイジンおよびメイラードペプチドともに豆味噌の「厚み」に寄与していることが示唆され、豆味噌におけるメイラード反応による香味生成の重要性が明らかとなった。
1) 加藤祥恵、井上裕、渡辺寛人、早瀬文孝、日本農芸化学会、3F26p12、(2015)
2) 安田佳代、松本朋大、渡辺寛人、早瀬文孝、日本農芸化学会、2J15p18、(2012)
3) Ogasawara, M., Katsumata, T., & Egi, M., Food Chemistry, 99(3), 600-604. (2006).

a *koku* attribute, soy miso (*mame miso*), Maillard peptide

講演番号：2A04p12
講演日時：3 月 18 日 17:05～ A 校舎 04 会場

渋味マスキング剤の開発を志向するロスマリン酸結合性大豆ペプチドの網羅的解析
Peptide array-based screening of rosmarinic acid-binding peptides as astringency-masking agents
○伊藤 圭祐[1]、増田 百花[1]、石井 剛志[2] ([1]静県大・食栄、[2]神戸学院大・栄)
○Keisuke ITO[1], Momoka MASUDA[1], Takeshi ISHII[2] ([1]Univ. Shizuoka, [2]Kobe Gakuin Univ.)

**【背景・目的】**「良薬口に苦し」と言われるように、多くの食品機能成分は好ましくない苦渋味を呈する。いかに健康によくとも、おいしくない食品を日常的に食べ続けることは困難であるため、食品機能成分の活用には苦渋味の低減（マスキング）が重要である。我々は苦味成分結合物質に苦味マスキング効果が期待できることに着目し、ペプチドアレイを用いて食品機能成分結合ペプチドを網羅解析する“苦味マスキング剤探索法”を開発した（2016 年度大会トピックス賞）。本研究では、渋味マスキング剤探索へのペプチドアレイの有効性の検証を目的として、渋味とともに脳機能改善効果の報告されているロスマリン酸をモデルとして、結合性を示す大豆たん白質由来ペプチドを探索した。

**【方法・結果】**主要大豆たん白質である β-コングリシニンのアミノ酸配列を全網羅するように、12 アミノ酸鎖長のペプチドをセルロース膜上に 298 種類化学合成し、ペプチドアレイを作製した。ペプチドアレイをロスマリン酸溶液に浸し、レドックスサイクル染色法によりロスマリン酸との結合を解析した結果、Pro-Ile-Tyr-Ser-Asn-Lys-Leu-Gly-Lys-Phe-Phe-Glu 等の顕著に結合能が高い 14 種類のペプチドを見出した。各ペプチドの N または C 末端からアミノ酸残基を一残基ずつ欠失させていく Deletion analysis により 308 種類のペプチドを解析し、ロスマリン酸との結合に寄与する最小配列を特定した。Alanine-scanning の解析結果と合わせ、これらのペプチドに含まれる Lys、Arg 残基がロスマリン酸との結合に重要であることが示されたことから、結合メカニズムの一端として静電的相互作用が示唆された。以上の結果より、苦味成分と同様に、渋味をもつ食品機能成分への結合ペプチドの探索およびその分子メカニズムの解析にもペプチドアレイが有効なツールであることが示された。一方、味認識装置を用いた物理化学的相互作用解析において、ロスマリン酸の渋味シグナル（センサー脂質膜との相互作用）を顕著に減少させる大豆ペプチド素材を見出した。大豆ペプチド素材に含まれるロスマリン酸結合ペプチドの渋味マスキング効果への寄与について詳細を解析中である。

※本研究の一部は SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施された。

peptide array, astringency-masking agent, rosmarinic acid

発表責任者：伊藤圭祐（sukeito@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：2A04p13
講演日時：3 月 18 日 17:20～ A 校舎 04 会場

# 鶏肉のイミダゾールジペプチドの加工特性に関する研究

# The analysis of Imidazole dipeptide contents in chicken meats during food processing

○神力 はるな[1]、近藤 知巳[2]、永浜 清子[1]、水光 正仁[1]、福井 敬一[2]、榊原 陽一[1]([1]宮崎大院 農工総合、[2]宮崎 JA 食開研)
○Haruna KOURIKI[1], Tomomi KONDO[2], Kiyoko NAGAHAMA[1], Masahito SUIKO[1], Keiichi FUKUI[2], Yoichi SAKAKIBARA[1] ([1]Interdiscip. Grad. Sch. of Agric. and Eng., Univ. of Miyazaki, [2]Miyazaki JA Food Res. & Develop. Inc.)

【背景・目的】　宮崎県は全国有数の鶏肉生産県であるとともに、県独自で開発した地鶏ブランド「みやざき地頭鶏」が広く知られている。鶏胸肉にはイミダゾールジペプチドが多く含まれ、近年はその抗疲労効果や抗酸化機能が注目されていることから、鶏肉の機能性成分に着目することで、アスリートや高齢者向けの食品開発に応用することが期待できる。今回我々は、鶏肉のイミダゾールジペプチドを有効に摂取できる加工食品の開発を目標に、遊離アミノ酸およびイミダゾールジペプチドの含量について調査するとともに、鶏肉の加熱処理温度、保蔵期間によるイミダゾールジペプチドへの影響について調べた。

【方法】　鶏肉およびその加工品の遊離アミノ酸、および、イミダゾールジペプチドであるアンセリンとカルノシンの分析は、島津製LC-MS高速アミノ酸分析システム(UF-Amino Station)で行った。鶏肉および加熱加工後のサンプルは2%スルホサリチル酸でホモジナイズし、遠心分離した上清について、ヘキサン処理による脂質除去およびフィルター処理を行い分析に供した。定量値は、同システムのソフトウエア(AminNavi)を用いて解析した。加熱加工試験には、県産ブロイラーのササミ肉を用いた。レトルトパウチに0.5%食塩水と共に封入して各温度で30分加熱処理した後、鶏肉およびスープ中のイミダゾールジペプチドとその他の遊離アミノ酸含量の変化を分析した。

【結果および考察】　加熱加工試験に用いた市販の県産ブロイラーのササミ肉中には100 gあたりアンセリンが 500 mg、カルノシンが 200 mg以上含まれていた。ササミ肉の部位を用いた加工試験において、加熱する温度を100、110、121、130℃と変えて調べた結果、レトルトパウチ内（鶏肉+スープ）のアンセリン、カルノシンの含量は加熱後も大きな差はみられなかった。さらに120℃でレトルト加工後に、常温（25℃）と加温（35℃）で保蔵した際の経時変化をみた結果、保蔵期間（２週～８週間）においても、同水準の量を維持していた。また、鶏肉中のアンセリン、カルノシンは、レトルト処理後常温２～４週間で多くがスープ中に移行し、以降はほぼ一定量を維持していた。以上の結果から、レトルト処理による加熱加工後もイミダゾールジペプチドは安定して含まれており、さらにレトルト加工は、殺菌効果によって常温で長期間保蔵できる利点もあることから、鶏肉のイミダゾールジペプチドを有効に利用するための加工技術として有用であることが示された。

imidazole dipeptide, chicken meat, retort

発表責任者：榊原陽一（ysakaki@cc.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：2A04p14
講演日時：3 月 18 日 17:35～ A 校舎 04 会場

Effects of sulfur-containing amino acids from onion extract on the production of testosterone and progesterone in mouse I-10 cells.

○Hsin-Jung Ho[1], Hitoshi Shirakawa[1], Yuya Nakayama[2], Shigeru Hiramoto[2], Hiroyuki Ikemoto[2], Michio Komai[1] ([1]Lab Nutri., Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [2]Nisshin Pharma Inc.)

[Objectives] Testosterone plays an important role in fetal development, sperm production, and the development of male secondary sex characteristics in men. Shortage of testosterone cause infertility and sexual dysfunction, as well as low testosterone levels can even predict the development of type 2 diabetes and cardiovascular disease and has been linked to increase risk of mortality in men. Sulfur-containing amino acids from onion are considered to have properties on steroidogenesis in men. In the present study, we investigated the effect of sulfur-containing amino acids (CA, MCSO, PCSO) on the production of testosterone and progesterone in mouse testis-derived tumor I-10 cells.

[Materials & Methods] Testosterone and progesterone productions after a 0.3~3 mg/ml extract of onion for several periods in I-10 cells were measured by ELISA. However, we kept the focus on the sulfur-containing amino acids here. The mechanism of these components on steroidogenesis were confirmed by measuring intercellular cAMP levels, and the activation of the enzymes that are related to cAMP levels by using inhibitors.

[Results] The extract of onion enhanced progesterone productions in a dose-dependent manner in I-10 cells, and it reached the peak at 9h. Its sulfur containing amino acids-MCSO and PCSO also enhanced progesterone levels, and the combination of MCSO and PSCO and the combination of CA, MCSO and PSCO increased both testosterone and progesterone levels. The alteration of intercellular cAMP levels also have been reported here. Moreover, these effects of the sulfur-containing amino acids were abolished by the co-treatment of the inhibitor of protein kinase A (H89) in I-10 cells. These results revealed that sulfur-containing amino acids from onion promoted steroidogenesis by modulating cAMP/PKA pathway in I-10 cells.

onion extract, sulfur-containing amino acids, testosterone

講演番号：2A04p15
講演日時：3 月 18 日 17:50～ A 校舎 04 会場

# 豆類の生育ステージ、登熟期のＧＡＢＡ量の比較

Comparison of legumes GABA levels in different growth stages and maturity stages.

○蓑島 良一[1,2]、椎葉 究[2] ([1]日清オイリオグループ株式会社、[2]東京電機大学理工学研究科)
○Ryoichi MINOSHIMA[1,2], Kiwamu SHIIBA[2] ([1]Central Research Laboratory, The Nisshin oillio Group, Ltd., [2]Department of Science and Engineering, Tokyo Denki University)

【緒言】γ-アミノ酪酸（ＧＡＢＡ）は、哺乳類の脳から発見されたタンパク質を構成しないアミノ酸の一種であり、中枢神経系の抑制に働く神経伝達物質であり、脳機能作用、記憶回線作用、ストエス低減作用、血圧の上昇を抑えると報告されている。また、微生物や植物中でのＧＡＢＡの役割についても検討されており、大腸菌、乳酸菌は高酸性下での耐酸性メカニズムの重要な要素として、植物中では虫の食害および病原菌などからの防衛や花粉管伸張の抑制として働くなどの報告がある。

ＧＡＢＡの生成においては漬物、キムチ、発酵乳製品から得られた乳酸菌や酵母、麹、大腸菌などの微生物や、玄米、お茶、トマト、カボチャ、豆類などの植物など幅広く報告されている。また、生体内でＧＡＢＡ含量を増加させる方法としてはお茶の嫌気処理、玄米の発芽処理、高圧処理、大豆もやしの二酸化炭素ガス処理などがあげられる。

豆類では、青大豆、黒大豆、きな粉、枝豆などの大豆製品にも含まれており、枝豆の品種である早生白山がＧＡＢＡを豆中に蓄積し、胚軸部にも多く蓄積するという報告はあるが、大豆の成長時期の違いによるＧＡＢＡ含量の変化や未熟大豆の莢と豆のＧＡＢＡ含量の違いを比較した報告はない。本研究は、大豆の成長時期、部位の違いがＧＡＢＡ含量に与える影響について検討した。

【方法】大豆品種タチナガハ（２００９年度産）の豆を２５℃、１２時間浸漬後、苗床中で発芽させた大豆の苗を圃場に定植、開花後２０日目で登熟前期の収穫、３５日目で登熟後期の収穫を行い、莢と豆のＧＡＢＡ量の比較、そして発芽大豆との比較を行った。また、発芽大豆、大豆もやし、未熟大豆をそれぞれ、豆:リン酸緩衝液＝１：５の割合で混合し、ホモジナイザー１０,０００ｒｐｍ、6℃、３分間粉砕し、スラリーを作成した。各スラリーについてＧＡＢＡ生成反応条件の検討を行った。

【結果及び考察】完熟大豆中のＧＡＢＡ量は４．５ｍｇ/１００ｇで他の豆類より低い値であったが、発芽期と登熟期でＧＡＢＡ含量が増加した。特に登熟前期は未熟大豆莢に８１．８ｍｇ/１００ｇとＧＡＢＡが多く蓄積し、登熟後期の未熟大豆莢はＧＡＢＡ量が急激に減少し、未熟大豆豆のＧＡＢＡが増加していた。登熟前期から登熟後期に向けて、ＧＡＢＡは未熟大豆莢から、未熟大豆豆へ移行した可能性が示唆された。

また、大豆青成長期でＧＡＢＡが含まれていた発芽大豆と未熟大豆でスラリーを作成し、ＧＡＢＡ生成条件を検討した結果、熱安定性、最適ｐＨで数値が異なっていた。

gamma-aminobutyric acid, soybean, pod shell

発表責任者：蓑島良一（r-minoshima@nisshin-oillio.com）

講演番号：2A05a02
講演日時：3 月 18 日 09:35～ A 校舎 05 会場

塩化ナトリウムを含む高分子水溶液の極限粘度とみかけの粘度の解析
Analysis of intrinsic viscosity and apparent viscosity of aqueous macromolecule solutions containing sodium chloride
佐藤 之紀[1]、○邱 泰瑛[1]、宮脇 長人[2,3] ([1]北見工大、[2]石川県大、[3]東京海洋大)
Yukinori SATO[1], ○Tai-Ying CHIOU[1], Osato Miyawaki[2,3] ([1]Kitami Institute of Technology, [2]Ishikawa Prefectural Univ., [3]Tokyo Univ. of Marine Science and Technology)

【目的】高分子の分類を電解質(E)と非電解質(NE)に限定して，高分子の無限希釈状態での極限粘度[η]および高濃度（2%，ただし，キサンタンガム，グアガム，ローカストビーンガムの場合は 0.5%）での回転粘度に与える塩化ナトリウムを含む溶媒中の高分子水溶液の極限粘度とみかけの粘度の解析から，高分子の電気粘性効果を比較した。
【方法】ポリエチレングリコール(PEG35000)など NE4 種類，キサンタンガムなど E4 種類を 0.01-0.03 g/dl の各濃度の NaCl 水溶液（0.1M 以下）に溶解させた。キャノンフェンスケ粘度計（Shibata）で動粘度を調べ，精密密度計（DMA4500, Anton Paar）で密度を求めて，粘度を算出した。さらに，Huggins の式を用いて，極限粘度[η]を求めた。一方，各高分子濃度が高い系での溶媒の電気粘性効果の追跡には，回転粘度計でずり速度 16.8 $s^{-1}$ での粘度($\eta^a$) を用いた。また，PEG35000 と DexT40 の溶液論を議論する場合には，2%では回転粘度計の測定限界以下であったのでキャノンフェンスケ粘度計を用いて測定し，同時に 10%濃度の溶液の回転粘度も比較した。
【結果】希薄領域での$-\Delta[\eta]/\Delta$NaCl concentration を比較したところ，キサンタンガム（17.6）＞アルギン酸ナトリウム>ペクチン(シトラスフルーツ由来)>ペクチン(リンゴ由来)(2.5)の順であり，NE である PEG35000，DexT40，グアガム，ローカルトビーンガムの値は 0.2 以下であったのに対し，E は大きい値を示した。これは，E の場合，純水中では分子内荷電の反発により分子は大きく膨潤するため，共存電解質の影響を強く受けて[η]が大きく変化したためと考えられる。また，従来から知られていた Stiffness parameter との相関を調べたところ，高い相関を示した。一方，NE の場合には分子内荷電の反発効果はほとんどなく，[η]へのイオン強度の影響は少ないと考えられた。
　他方，高濃度領域での$\eta^a$に対する電解質濃度の影響は，E，NE ともに小さかった。これは，実験濃度領域での高分子間相互作用には静電的相互作用はあまり関与していないことを反映していると考えられた。さらに，温度を 40℃から 5℃まで変化させると，高分子の物理的絡まり効果が支配的な xanthan gum の Ea がほぼゼロであった以外は，他の高分子水溶液の Ea は溶媒の Ea とそれほど大きな大差がなかった。このことから，溶液粘度に対する温度効果は，ほとんど溶媒－溶媒分子間相互作用によるものであると思われた。一方，NE である PEG35000 と DexT40 溶液の粘度を回転粘度計とキャピラリー粘度計でそれぞれ測定しても，低濃度の高分子溶液の結果と同様に，高濃度高分子濃度領域での電解質濃度の影響はほとんどなかった。

water, viscosity, macromolecule

発表責任者：佐藤之紀（yukisato@mail.kitami-it.ac.jp）

講演番号：2A05a03
講演日時：3 月 18 日 09:50～ A 校舎 05 会場

電気物性を用いたレトルト殺菌行程中の米飯の品質評価
Quality evaluation of cooked rice during retort sterilization process using electric physical properties
○桑原 悠史[1]、川井 清司[2]、羽倉 義雄[2]([1]広大生生、[2]広大院生物圏)
○ Yushi KUWAHARA[1], Kiyoshi KAWAI[2], Yoshio HAGURA[2] ([1]APP.Bio. Hiroshima Univ., [2]Biosphere Sci., Hiroshima Univ.)

【目的】 レトルト食品は、保存性や簡便性に優れていることから、広く一般家庭で利用されている。また、離乳食や介護食・医療食としても、その生産量は増加している。現在レトルト食品の殺菌条件は、F 値などの殺菌目的の指標のみで決定され、レトルト殺菌装置内での調理過程には、あまり注意が払われていない。これは、レトルト殺菌装置内が高温・高圧であるため、内部の食品の調理状態や加工程度（例えば、でんぷんの糊化やたんぱく質の変性などの加熱程度）を連続的に計測することができないことが原因である。従って、レトルト食品の品質評価については、殺菌後の開封検査が主な評価手法になっており、殺菌中の評価は行われていない。そこで本研究では、レトルト殺菌中の食品の変化を計測する手法として電気物性に注目することにした。具体的には、レトルト殺菌装置内に設置した食品の電気物性を測定することにより、殺菌中の食品の調理状態や加工程度を非破壊・連続的に計測する方法を検討した。
【方法】 米ー水系試料またはデンプンー水系試料をトレー状のレトルト容器に充填・密封し、実験試料（モデルレトルト米飯）を作成した。一部の実験試料には、中心温度測定用の温度ロガーを入れ密封した。レトルト殺菌装置内にフッ素樹脂加工を施した網状の平行平板電極(電極板面積:38500m㎡、電極板間距離:30mm）を設置した。殺菌装置のサービスポートを利用して、電極板と装置外の LCR メータを同軸ケーブルを介して接続した。実験試料を電極板間に設置し、蒸気殺菌モードを用いて殺菌操作を行った。殺菌条件は、一次加熱 5 分、103℃での予熱 5 分、二次加熱 3 分、120℃での殺菌 30 分、冷却 10 分とした。同時に、LCR メータを用いて電気物性（インピーダンス、キャパシタンス）の測定を 1kHz ～100kHz 間の 200 点について 2 分ごとに行った。
【結果】 フッ素樹脂加工を施した電極板を用いることで、殺菌工程中の食品の電気物性の変化を連続的に測定することが可能であった。食品の電気物性には温度依存性があるため、昇温中の電気物性の変化には、デンプンの糊化変化に加えて温度変化の情報を含まれている。しかし、殺菌温度および試料温度が一定となった殺菌工程（120℃、30 分）においても試料のインピーダンスが変化していた。そこで、ほぼ同一条件で作成した試料の糊化度を測定したところ、殺菌開始時点でほぼ 100%であった。これは、殺菌工程中に食品の状態が変化していることを示唆している。また、殺菌終了後の試料を再殺菌（2nd run）し、最初の殺菌（1st run）工程と比較したところ、糊化に伴う変化に対応するインピーダンスの変化が認められた。

electric phisical properties, sterilization, retort

発表責任者：羽倉義雄（hagura@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：2A05a04
講演日時：3 月 18 日 10:05～ A 校舎 05 会場

# 高速せん断による高アミロース米ゲルにレトルト加熱処理が及ぼす効果

# Effect of retort heat treatment for high-amylose rice gel by high-speed shear treatment

○井坂 圭良、柴田 真理朗、萩原 知明（海洋大）
○Keisuke ISAKA, Mario SHIBATA, Tomoaki HAGIWARA (Kaiyo Univ.)

【背景・目的】

近年、日本の米の消費量は減少しており、米の新規用途の拡大に関する研究が展開されている。米ゲルは、飼料米として多く利用されている高アミロース米を、食用とするための一手段となり得ることから、その応用が期待されている。また、米ゲルの流通のために、レトルト加熱処理が提案されている。本研究では、レトルト加熱処理した米ゲルの動的粘弾性の変化や老化度を機器測定により測定し、米ゲルの品質に関する特性を明らかにすることを目的としている。

【実験】

試料として、高アミロース米であるモミロマン、愛知 893 号、ミズホチカラの精白米を使用した。なお、試料米のアミロース含量はそれぞれ、24.6%、25.6%、19.5%であった。試料米を 3 倍量の水に 1.5 時間浸漬した後、炊飯器のおかゆモードで糊化させて得られた糊化米にカッターミキサー（Blixer-5 Plus、Robot coupe）で 90 秒間の高速せん断（1500 rpm）を適用し、米ゲル試料を得た。得られた米ゲル試料をポリカーボネート製の型（直径 35 mm、厚さ 2 mm、丸形）に充填し、小型真空包装機（EVC Ⅱ型、古川製作所）でレトルト包装した後、レトルトシュミレーター（RCS-40R、日阪製作所）でレトルト加熱処理（120℃、20 min）を行った。得られた米ゲル試料を室温下で所定の期間（0～30 日）貯蔵し、動的粘弾性測定を行い、物性変化を評価した。また、試料に脱水、乾燥処理を行って得られた粉末試料について、X 線回折装置（Ultima IV，Rigaku）による測定を行い、老化度を評価した。

【結果】

得られた米ゲルの動的粘弾性は、品種にかかわらず、貯蔵期間の延長に伴って増大する傾向が見られた。また、その程度の大きさはアミロース含量の高いものほど大きいという傾向が見られた。X 線回折では、一部の試料で 13° 付近のピークがレトルト加熱処理後に消失した。これはレトルト加熱処理が米ゲル中の結晶領域を減少させたことを示唆している。また、貯蔵期間の延長に伴って、18° 付近に若干のピークの出現が確認された。これは、米ゲル中の結晶領域の増加を示しており、米ゲルの老化が進行しているものと推測される。

viscoelastic property, X-ray diffraction, retrogradation

発表責任者：柴田真理朗（mshiba0@kaiyodai.ac.jp）

講演番号：2A05a05
講演日時：3 月 18 日 10:20～ A 校舎 05 会場

# 米菓の物性と構造が口どけ感に及ぼす影響

# Effects of physical properties and internal microstructures on melt-in-mouth sensory characteristics of rice crackers

○細井 友加里[1]、山谷 健太[2]、竹井 亮[2]、丸山 健太郎[2]、西津 貴久[1]([1]岐阜大・応生、[2]亀田製菓株式会社)
○Yukari HOSOI[1], Kenta YAMAYA[2], Ryo TAKEI[2], Kentaro MARUYAMA[2], Takahisa NISHIZU[1]
([1]Gifu Univ., [2]KAMEDA SEIKA CO., LTD.)

【目的】
食品の口どけ感はおいしさに関わる重要な因子の一つである. チョコレートのような油脂性食品では油脂含量や融点が口どけ感に関与するという報告がある. 一方，米菓の口どけ感に関する報告はほとんどなく，その支配因子は未だ明らかになっていない. 本研究では米菓のもち米やうるち米の配合による材料特性の違い，食塊の物性，微細構造が口どけ感に及ぼす影響を明らかにすることを目的とする.

【実験方法】
口どけ感に差異があると報告のある米菓 6 種を試料とし, 熟練したパネルに対して用いられる採点法と評価が容易な順位法で評価した. パネルは成人男女を対象とした.
唾液の吸収速度についてはメトロノーム（70 /min）に合わせて試料をパネルに咀嚼してもらい，咀嚼前後の試料の質量と嚥下するまでに要した時間から算出した.
食塊中の固形粒子の粒度分布をふるい分析法で測定した. 食塊を 99.5 %エタノールに 20 分間浸漬して脱水したものを，目開きが 10 段階のふるい（53 μm～1700 μm）でふるい分けた後，45 ℃下で 90 分間乾燥し，ふるい上の質量を測定した.
食塊の物性を測定するために，コーヒーミルで粉砕した試料を 20 mM リン酸緩衝液に分散し，微生物由来α-アミラーゼ（キシダ化学）溶液を添加して RVA 粘度（160 rpm, 10 min, 37 ℃）を測定した.
試料の微細構造を把握するために，X 線μCT を用いて気泡の膜厚と気泡径を数値化した.

【結果・考察】
米菓の官能試験について，順位法の結果を正規化順位法による距離尺度へ変換したところ，正規化評点と採点法による評点には相関があり，順位法は有効であることが明らかとなった. 以降，順位法を用いて官能試験を行った. 口どけ感が良いものほど, 気泡の膜厚は小さく, 気泡の平均径は大きくなった. また唾液吸収速度は大きく，粒子径の小さい粒子質量が大きいという傾向がみられた.

rice cracker, melt-in-mouth, sensory evaluation

発表責任者：細井友加里（s8024068@edu.gifu-u.ac.jp）

講演番号：2A05a06
講演日時：3 月 18 日 10:45～ A 校舎 05 会場

# Quality Characteristics, Physiological Properties, and SDS-PAGE of Mozzarella Type Soybean Cheese

○Jin Kyung KIM, Moon-Hee LEE, Sook-Young LEE (Chung-Ang University , Department of food and nutrition)

The aim of this study was to investigate the isoflavone analysis, antioxidant activity, SDS-PAGE pattern, and texture of soybean cheese prepared with soy flour and roasted soy flour treated with 0.3 % Flavourzyme® for different proteolysis times(0, 20, 25 and 30 min). To develop mozzarella type soybean cheese, the heat spreadability, texture, and sensory characteristics of soybean cheese added with different amounts of cocoa butter(8, 10, 12 %) and salt(0.3, 0.5, 0.7 %) were examined.

In isoflavone analysis, the contents of both aglycone(daidzein and genistein)of daidzin and genistin and total isoflavone were the highest in the soybean cheese proteolyzed for 25 min and 30 min. The value of DPPH radical scavenging was the highest in the soybean cheese proteolyzed for 25 min. In SDS-PAGE pattern, the 11S bands, related with cohesiveness, were slightly degraded by Flavourzyme® treatment in the soybean cheese prepared with both soy flour and roasted soy flour. However, 7S bands were much more degraded by Flavourzyme® treatment in the soybean cheese prepared with roasted soy flour than with soy flour.

The value of heat spreadability of soybean cheese added with roasted soy flour, cocoa butter content of 12 % and salt content of 0.5 % was the highest. In texture profile analysis, the hardness and cohesiveness of soybean cheese with roasted soy flour were lower than those with soy flour. The lower the hardness, the higher contents of cocoa butter and the lower contents of salt. The lower the adhesiveness, the higher contents of cocoa butter. The lower the cohesiveness, the higher contents of cocoa butter and salt. In the sensory evaluation of soybean cheese, the higher score of flavour, the lower contents of cocoa butter and the higher contents of salt. The higher score of softness, the higher contents of cocoa butter.

In considering the above results, the stretchability of mozzarella type soybean cheese was thought to be improved by controlling protease treatment, roasting of soy flour, the type and amount of lipids, and salt amount.

Mozzarella type soybean cheese, Quality characteristics, Heat spreadability

発表責任者：Sook- Young Lee（syklee@cau.ac.kr）

講演番号：2A05a07
講演日時：3 月 18 日 11:00～ A 校舎 05 会場

# ゲル状食品の弾性挙動の解析

Evaluation on elastic behavior of food gel

○鬼島 直子[1]、砂押 諒[1]、石川 大太郎[1,2]、藤井 智幸[1,2] ([1]東北大農、[2]東北大院)
○Naoko KIJIMA[1], Ryou SUNAOSHI[1], Daitaro ISHIKAWA[1,2], Tomoyuki FUJII[1,2] ([1]Tohoku Univ., [2]Tohoku Univ. graduate school)

【目的】食べ物のおいしさには、味・香りだけではなくテクスチャーが大きく関わっている。テクスチャーは、噛み切るときの固さのみならず、なめらかさや粘りなど複合的に成り立っているため、噛み切る強さに対応した破断強度のみではそれを捉えることは難しい。また、食品の物性は成分組成のみならず構造に依存しているため、構造物性相関の解明が求められている。弾性には、エネルギー弾性と、エントロピー弾性（ゴム弾性）があり、ゲル状食品においてはエントロピー弾性の寄与が大きいと考えられる。そこで、ゲル状食品のテクスチャーの評価方法として、ゴム弾性体として捉えた評価方法について実験的に検討を行った。

【方法】乳、卵などのタンパク質を原料とするゲル状食品について、応力 - 歪曲線を測定し、解析を行った。ゲル状食品は、各種チーズ、プリン、だし巻き卵などを用い、10 ㎜角の立方体に成形し、25℃の室温下で圧縮試験に供した。クリープメータ RE2 - 33005s（株式会社山電）にて、プランジャーは直径 30 ㎜の円筒型を用い、圧縮速度 0.1 ㎜/s、圧縮歪 0.9 まで圧縮した。各ゲル状食品について 10 回以上測定した。

【結果】理想ゴム弾性体の伸長応力 $\sigma_s$ は長さ $L_0$ であった試料が L になると、

$$\sigma_s = G(\lambda - 1/\lambda^2) \quad (1)$$

となる。ここで G はゴムのヤング率、λ（＝L／$L_0$）は伸長比である。ただし、この式は微小変形領域でしか成立しない。そこで、大変形領域まで拡張した BST 式：

$$\sigma_c = -2E/3n(\lambda^n - 1/\lambda^{2n}) \quad (2)$$

を用いることとした。ここで $\sigma_c$ は圧縮応力、E は圧縮時のゴムのヤング率、n は非理想性指数である。市販のプロセスチーズを選び、破断強度が 8.01×$10^4$ Pa、破断歪が 0.43 と求められた試料に関して、その応力-歪曲線に BST 式を適用したところ、歪 0.3 まで良好に記述することができた。ゴムのヤング率は 7.75×$10^4$ Pa、非理想性指数は 1.094 となった。このように、応力-歪曲線から破断強度、破断歪に加えてゴム弾性理論に基づいた弾性パラメーターE と n を求めることによりゲル状食品の弾性挙動を評価することが可能と考えられた。

food gel, elastic behavior, rubber elastic

講演番号：2A05a08
講演日時：3 月 18 日 11:15～ A 校舎 05 会場

# 冷菓の摂食・嚥下特性とおいしさに関する研究

# Study on ingesting/swallowing properties and sensory character of the ice cream

○佐々木 慶一[1]、井上 恵介[1]、渡部 加苗[1]、岩井 大[1]、池田 三知男[1]、堀 一浩[2]、小野 高裕[2]([1]森永乳業・研究本部、[2]新潟大学大学院医歯学総合研究科)
○Keiichi Sasaki[1], Keisuke Inoue[1], Kanae Watanabe[1], Hajime Iwai[1], Michio Ikeda[1], Kazuhiro Hori[2], Takahiro Ono[2] ([1]Morinaga Milk Industry Co.,LTD・R&D Division, [2]Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences)

【目的】冷菓は高栄養で嗜好性も高く、口腔内で融解する特性を持つことから、健常者だけでなく咀嚼機能の低下が見られる要介護者にとっても適性の高い食品であると考えられる。これまでの取り組みから、原料の配合割合によって冷菓の摂食・嚥下特性が変化することを明らかにした。本研究では、摂食・嚥下特性に加えて、官能評価と香気分析を用い、冷菓の「おいしさ」に関わるパラメーターを抽出することを目的とした。
【方法】ミックスの粘度やコーティングしたチョコの付着量・物性が異なる一口サイズ（10g）の冷菓試料（種類別：アイスクリーム、乳脂肪分 8%、乳固形分 18%）を 6 検体作製した。半分（5g）に分割した-20℃の冷凍庫から取り出した直後の試料を 10 名の被験者に自由摂食・嚥下させたときの咬筋および舌骨上筋群の活動量を筋電位測定装置システムで測定・解析し、嚥下音を喉頭マイクで測定、音響解析ソフトウェアで解析した。また、62 名の一般の評価者を対象とした上記試料についての採点法による官能特性及び嗜好性の評価、及び訓練された 10 名のパネリストを対象とした Temporal Dominance of Sensations（TDS）法による試料摂食時の経時的な官能特性の変化を評価した。また、口腔モデルの１種である Retronasal Aroma Simulator（RAS）にサンプルを投入し、リリースする香気成分を捕集して Gas Chromatography/Mass Spectrometry で解析する手法により、喫食中に口腔内に広がる香りを評価した。
【結果】ミックス粘度が高い、またはチョコ付着量が多い試料摂食時のひと咬み当たりの筋活動量は増加し、嚥下時の食塊流動音継続時間は短縮した。このことより、これらの試料は咬みにくいが、食塊がまとまりやすくなるため、飲み込みやすくなることが示唆された。一方、採点法による嗜好性評価の結果から、中程度のミックス粘度やチョコ付着量が多い試料が好まれることが確認された。TDS による試料の経時的な官能評価では、ミックス粘度が高い試料は他の試料と比較して風味の持続性が高くなった。中程度のミックス粘度やチョコ付着量が多い試料は食べ始めにココアの風味が強く、中間からラストに甘味を感じることが分かった。また RAS による香気分析では、ミックスの粘度が高いほど試料のフレーバーリリースが低下する傾向が見られた。これらの結果から、冷菓試料のミックス粘度とコーティングしたチョコの付着量は、摂食様態、フレーバーリリースの両方を変化させ、これらが総合的に嗜好性に影響を与えていることが示唆された。

ice cream, swallowing, TDS

講演番号：2A05a09
講演日時：3 月 18 日 11:30～ A 校舎 05 会場

# Enzymatic interesterification of soybean oil, palm stearin and coconut stearin blends

○Lakum Ruttiya, Sonwai Sopark (Silpakorn Univ.)

Enzymatic interesterification (EI) is an alternative processes to produce zero or reduced *trans*-fat foods with acceptable functional properties. It could be a feasible way of producing low-*trans* plastic fat with advantages of region specificity. High intake of *trans* fatty acid (TFA) is associated with increased LDL, decreased HDL, and increased total HDL cholesterol. In this work, *trans*-free interesterified fats were prepared from blends of soybean oil (SBO), palm stearin (PS), and hard fraction of coconut oil (coconut stearin, hCO) in different ratios (0:70:30, 10:60:30, 20:50:30, 30:40:30 and 40:30:30, % wt.) using immobilized *Mucor miehei* lipase at 60 °C for 8 h with a mixing speed of 300 rpm. The physical properties and the crystallization and the melting behavior of the interesterified blends were investigated. Lipase-catalyzed interesterification significantly changed the physical and thermal properties of the SBO:PS:hCO blends. After EI, the melting completion temperature, $T_{mc}$, of all the blends decreased from 50-54 ºC to 32-44 ºC owing to the reduction in solid fat content (SFC) at all temperatures. At 35 ºC, the SFC of the blend containing 20% soybean oil decreased from 11.00 to 2.6 % after EI and it had SFC lower than 3.5% at 33.3 ºC. The small needle-shaped crystals were observed in the sample and the β' polymorphic form was found to be the dominant polymorph in the sample were after EI. Therefore, the interesterified blend 20:50:30 has a potential for future use as a *trans*-free plastic fat for many food applications such as margarines.

Enzymatic interesterification, Plastic fat, *Trans*-free

講演番号：2A05a10
講演日時：3 月 18 日 11:45～ A 校舎 05 会場

# 油滴サイズの異なるフラワーペーストの口どけ食感の解析　～繰り返し圧縮における物性・構造の変化～

# Analysis for "KUCHIDOKE" texture of flour paste with different size of oil droplet ~changes in physical properties and structure by repeat compressions~

○山下 智史[1]、河原田 啓希[2]、古川 周平[2]、中村 卓[1]([1]明治大農・農化、[2]オリエンタル酵母工業(株)・食品研究所)
○Satoshi Yamashita[1], Hiroki Kawarada[2], Shuhei Furukawa[2], Takashi Nakamura[1] ([1]Meiji Univ., [2]Oriental Yeast Co.,Ltd)

【目的】フラワーペーストとは、澱粉を主原料とし、油脂・砂糖・粉乳等を混合、乳化、加熱することによって作製されるクリームパンなどのフィリングである。フラワーペーストは互いに混じり合わない水と油を含んでおり、その乳化処理により油滴サイズの異なる o/w エマルションを形成している。一般的に、油滴サイズは食感に影響を及ぼすことが知られている。

また、食感は物性的・構造的要素によって構成される。これらの要素は咀嚼過程(第一咀嚼、第二咀嚼以降、嚥下）の時間軸に沿って変化し、この変化の組み合わせがおいしさを決定する。特にフラワーペーストにおいて重要な口どけ食感は第二咀嚼以降の物性的な広がりやすさと破壊構造が重要であり、これらの要素における唾液(水)の影響は大きい。そこで、本研究では油滴サイズの異なるフラワーペーストの口どけ食感の差を、水存在下での繰り返し圧縮試験による物性・構造の変化から明らかにすることを目的とした。

【方法】油滴サイズの異なるフラワーペーストを作製するため、2 種類の乳化処理を行った。真空攪拌乳化（12,000 rpm)したものを‘E:乳化’、攪拌乳化後さらに高圧乳化(10 MPa)したものを‘H:高圧’とした。フラワーペースト E,H について、物性測定として距離を加算しながら圧縮を繰り返す（繰り返し圧縮)試験と動的粘弾性試験を行った。繰り返し圧縮試験は水の存在下で行い、試験時の破壊の様子をデジタルカメラで撮影した。また、各種顕微鏡を用いて微細構造を観察した。

【結果】共焦点レーザー走査顕微鏡観察の結果、油滴サイズは E が約 10 μm、H は約 1 μm であり、油滴サイズの異なるフラワーペーストが作製された。官能評価の結果、油滴サイズの大きな E は口どけが良く、小さな H は口どけが悪かった。繰り返し圧縮試験の結果、水非存在下では E、H とも圧縮時の荷重は圧縮回数の増加と共に上昇したが、水存在下ではどちらも 3 回目圧縮時に荷重の低下が見られた。E では 3 回目圧縮時の荷重低下後、さらに 5 回目まで低下したのに対し、H では 3 回目圧縮時の荷重低下後、一定の荷重を維持した。また、デジタルカメラの撮影の結果、E と H は圧縮時の横方向の伸び率に差が見られ、E は H より伸び率が高かった。また試験後の破片は、E が分散状であるのに対し、H は塊状であり、破壊構造に差が見られた。さらに、繰り返し圧縮後を想定した 80%圧縮時の動的粘弾性試験では E の 複素粘度(η*)は H より低く、この低い粘度が分散した破片をもたらしたと考えられた。さらに、顕微鏡を用いた破壊構造の観察結果についても報告し、口どけとの関連性を考察する。

texture, flour paste, repeat compression test

講演番号：2A05p01
講演日時：3 月 18 日 14:00～ A 校舎 05 会場

超音波特性を利用した等温保持中の硬化ヤシ油結晶化過程のモニタリング
Monitoring of crystallization behavior of hydrogenated coconut oil under isothermal condition by using ultrasonic measurement

○森 大獎[1]、勝野 那嘉子[2]、増子 朝貞[3]、松浦 傳史[3]、西津 貴久[2]([1]岐阜大院・応生、[2]岐阜大・応生、[3]三菱化学フーズ（株））
○Daisuke MORI[1], Nakako KATSUNO[2], Tomosada MASUKO[3], Tsutashi MATSUURA[3], Takahisa NISHIZU[2] ([1]Graduate School of Applied Biological Sciences, Gifu Univ., [2]Gifu Univ., [3]Mitsubishi-Kagaku Foods Corporation)

【目的】当研究室では，油脂の冷却中・保存中における結晶化過程の超音波によるモニタリングについて検討してきた。これまでの研究から，添加した乳化剤の種類によって添加したバルク油脂の結晶化の進行は異なってくるが，超音波位相速度にその違いが反映されることを明らかにした。本研究では，等温保持中の結晶成長，添加剤により変化させた結晶化挙動に着目し，超音波位相速度・振幅強度を利用して評価することを目的とした。

【方法】硬化ヤシ油（融点：28.8 ℃）を用い，ショ糖ステアリン酸エステル，ショ糖オレイン酸エステル，ショ糖ラウリン酸エステル (S-170, O-170, L-195, 三菱化学フーズ製)を添加剤とした。70 ℃まで加温し完全に融解させた硬化ヤシ油に，乳化剤をそれぞれ 0.5，2.5，5.0 wt%添加し，均一に分散させた後，再び 70 ℃まで加温したものを試料として用いた。38 ℃から 25 ℃まで 1 ℃/min の変温速度で降温した後，25 ℃で等温保持した。
超音波測定には経路長 10 mm の石英セルを用いた。パルサー(ユタカ電子製作所製・特注品)からの信号を超音波送波子に入力し，セル内の試料中を伝播してきた超音波振動信号を受波子経由でオシロスコープ(LeCroy 製・wavesurfer24Xs)に取り込んだ。得られた測定データを FFT 解析し，0.46 MHz の位相速度および振幅強度を算出した。超音波測定と同一過程の示差走査熱量測定(DSC)，小角 X 線散乱測定(SAXS)を行った。また，温度変化に伴う油脂の密度変化を測定するためピクノメーターを用いた。

【結果・考察】38℃から 25℃までの降温過程において位相速度，振幅強度は単調に増加したが DSC，SAXS の結果から結晶生成は確認できなかった。一方，密度は降温中に増加したが，位相速度の増加率に対して小さく，圧縮率の減少により位相速度が増加したと考えられる。
25℃の等温保持過程では，位相速度は一定の時間をおいてから急増した。急増するまでの時間（誘導期）は添加剤の種類，添加量によって異なる傾向を示した。その増加開始点は DSC の測定結果から，油脂結晶化開始点を示すことが明らかになった。また，振幅強度は添加剤の種類によって大きく異なる傾向を示し，非結晶領域の状態を反映していることが示唆された。

Ultrasonic, Fat crystal, Hydrogenated coconut oil

発表責任者：西津貴久（nishizu@gifu-u.ac.jp）

講演番号：2A05p02
講演日時：3 月 18 日 14:15～ A 校舎 05 会場

杵つき餅の製造過程における力学的物性のインライン計測
In-line measurement of mechanical properties of rice cake during pounding process with pestle
○植松 周作[1]、川井 清司[2]、羽倉 義雄[2] ([1]広大生生、[2]広大院生物圏)
○ Shusaku UEMATSU[1], Kiyoshi KAWAI[2], Yoshio HAGURA[2] ([1]App.Bio.Sci.Hiroshima Uni, [2]Biosphere Sci.Hiroshima Uni)

【背景と目的】
食品において、食感すなわちテクスチャーは、おいしさや飲み込み易さに影響を及ぼす重要な要素である。特に食品産業では、均質の製品を安定かつ大量に製造する必要があり、製品のテクスチャー制御やその評価技術も重要な課題になっている。しかし、食品の原料は、季節や産地により物性が大きく異なり、また配合や加工時間、周囲の環境(温度、湿度)などが製品の出来上がりにも影響を与える。そのため、物理的な食品加工中のテクスチャー（力学的物性）変化を連続的に確認する手法が求められている。
本研究では、加工中の食品の力学的物性変化をインラインで計測する方法を検討した。具体的には、製造中に力学的物性が大きく変化する食品の代表例として餅を対象とし、「搗く」という物理的な加工の中で、蒸したもち米から餅になるまでの力学的物性の変化を、杵の落下時の衝撃応答から連続的に読み取ることを目指した。
【方法】
実験試料として蒸したもち米を用いた。もち米を水浸漬（吸水時間 90 分間）した後、水切り操作を 25 分間行った。市販の餅つき機の蒸しモードを用い、もち米 150g に対し水 150g を加えて、蒸し操作を行った。蒸し上がったもち米 50g を直径 52㎜ のテフロンビーカに入れ、ロードセルを取り付けた重さ 5.98 ㎏、直径 32㎜ のステンレス棒を高さ 40㎜ から連続的に自由落下させ、もち米を搗いた。任意の搗き時間（0 分、2 分、4 分、8 分)ごとにデジタルオシロスコープを用い、ステンレス棒に取り付けたロードセルが受ける衝撃荷重の変化（衝撃波形）を測定した。また、各搗き時間の試料のテクスチャーを評価するため、材料試験機を用いて静的な圧縮試験及び動的な粘弾性試験を行った。
【結果および考察】
ステンレス棒（杵）が受けた衝撃波形には、谷部と山部が確認できた。それぞれの搗き時間における衝撃波形を比較すると、谷部には大きな変化が見られなかったが、山部には搗き時間に伴う変化が認められた。そこで、搗き時間と山の高さ及び山部の面積の関係を整理したところ、両者ともに搗き時間 0 分から 4 分までに大きく増加し、それ以降は緩やかに増加する傾向が確認できた。また、この衝撃波形測定の結果と材料試験機を用いたテクスチャー測定の結果との間には、一定の関係性が認められ、加工中の食品（餅）の力学的物性変化をインラインで計測できる可能性が示唆された。

rice cake, impact loading, mechanical properties

発表責任者：羽倉義雄（hagura@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：2A05p03
講演日時：3 月 18 日 14:30～ A 校舎 05 会場

# 生シラスおよび冷凍生シラスの力学的物性を用いた鮮度評価

Freshness evaluation of raw and frozen Shirasu (whitebait) based on mechanical property

○平良 佳雅[1]、川井 清司[2]、羽倉 義雄[2] ([1]広大生生、[2]広大院生物圏)
○Yoshimasa TAIRA[1], Kiyoshi KWAI[2], Yoshio HAGURA[2] ([1]App. Bio. Sci. Hiroshima Univ., [2]Biosphere Sci. Hiroshima Univ.)

【目的】 生シラスの鮮度は漁獲直後から急激に低下するため、新鮮な生シラスの状態で全国流通させることは困難である。そこで、新鮮な生シラスを凍結処理し、冷凍状態で輸送・保管し、喫食時に解凍する方法で、生シラスの流通が行われるようになってきている。冷凍生シラスの品質評価を行う場合、漁獲直後から凍結処理に至るまでのシラスの鮮度変化や、凍結・解凍時の鮮度変化を正確に捉えておく必要がある。一般に水産物の鮮度評価では、K 値などの化学的な測定方法が用いられているが、このような測定には専用の分析装置が必要であり、また、前処理に時間がかかるなどの課題もある。特に生シラスでは鮮度変化が急激であるため、簡便かつ迅速に鮮度を評価する方法が必要となる。

そこで本研究では、比較的短時間に計測が可能な力学的物性を用いて、生シラスの鮮度評価を行う方法を検討した。具体的には、漁獲直後の生シラスの力学的物性および K 値を経時的に測定し、両者の関係を明らかにすることにより、力学的物性を用いた鮮度評価の可能性を検討した。また、この方法を用いて、冷凍生シラスの解凍条件が解凍後の鮮度指標（硬さおよび K 値）に与える影響についても検討した。

【方法】 広島県呉市音戸町で水揚げされた漁獲直後の生シラスを実験試料とした。これを、0℃、5℃、10℃の 3 つの貯蔵温度でそれぞれ保存した。保存温度、保存時間が異なる生シラスの力学的物性測定およびK値の測定を行った。力学的物性測定には、直径 20mm のプランジャーを取り付けた材料試験機（EZ-SX 島津製作所）を用いた。内径 40mm×高さ 20mm のアルミニウム製容器に生シラスを高さ 15mm 充填し、この生シラス充填層の圧縮強度（硬さ）を測定した。K 値測定では、高速液体クロマトグラフィー（LC ユニット島津製作所）を用いた。また、異なる 3 社の冷凍生シラス製品を、流水解凍（10 分）および冷蔵庫での自然解凍（3 時間半）の 2 つの条件で解凍し、力学的物性および K 値の測定を行った。

【結果と考察】 漁獲直後の生シラスを各保存温度で保存した結果、生シラス充填層の圧縮強度（硬さ）は保存時間の経過とともに低下した。一方、K 値は保存時間とともに上昇した。また、保存温度が高いほど、圧縮強度および K 値の変化速度は大きくなった。圧縮強度と K 値との間には良好な負の相関が得られた。以上の結果より、生シラス充填層の圧縮強度を測定することで鮮度を評価できる可能性が示唆された。冷凍生シラスの解凍条件が鮮度指標に与える影響については、明瞭な差は認められなかった。しかし、解凍後の生シラスの圧縮強度および K 値の経時変化には差異が認められた。

Shirasu (whitebait), K value, mechanical property

発表責任者：羽倉義雄（hagura@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：2A05p04
講演日時：3 月 18 日 14:45～ A 校舎 05 会場

# MIP 発光分光分析によるミネラル一斉分析を用いた農産物の特徴把握方法の検討

Usefulness of mineral simultaneous analysis by MIP emission spectrometry for understanding the characteristics of agricultural products

○藤野 加奈子、水上 浩之（熊本県産技セ）
○Kanako FUJINO, Hiroyuki MIZUKAMI (Kumamoto Industrial Research Institute)

【背景と目的】近年、生活習慣病予防や健康寿命延伸の観点から、消費者の食品の栄養バランスや機能性に対する関心は高まる傾向にある。地域の食材とその未利用部位の用途開発において、主要元素であるミネラルの簡便で迅速な分析法の確立は、素材や製品の栄養特性を把握するにあたって有効なツールとなり得る。食品中の元素を同時定量する方法として「衛生試験法」では誘導結合プラズマ(ICP) 発光分析法が採用されているが、マイクロ波プラズマ(microwave induced plasma:MIP) 発光分析法を用いた食品中の元素分析報告例は少ない。そこで、農産物のミネラル特性や季節間変動の傾向を把握することを目的に、ミネラル一斉分析に適した MIP 発光分析条件の検討と、熊本県産ボタンボウフウのミネラル一斉分析を行い、得られた分析値を基にこれらの把握を試みた。

【方法および結果】熊本県天草市の農場で平成 25 年 7 月上旬と 11 月中旬に栽培されたボタンボウフウを、柔らかい若葉と、生育して硬く濃緑色となった硬葉（通称名）とに分別して、葉部と直径 5 mm 以下の茎部を可食部とみなし、栽培農場と栽培時期の異なるボタンボウフウの一般成分および MIP 発光分析法による主要ミネラルの分析を行った。若葉と硬葉のミネラル含有量を比較したところ、カルシウムとマンガンは若葉よりも硬葉の方が多く、硬葉中のカルシウムは 220 mg/100 g 以上を示した。一方でマンガンの含有量は農場間差も大きく、亜鉛でも同様の傾向がみられた。これらの主要ミネラル含有量を用いて主成分分析を行い、各サンプルの主成分得点をプロットとして示した結果、若葉と硬葉とにグルーピングが可能であったことから、ミネラル組成に基づく農産物の特徴把握の可能性が示された。

analysis, mineral

講演番号：2A05p05
講演日時：3 月 18 日 15:00～ A 校舎 05 会場

# Wilhelmy 法を用いたコール酸ナトリウム水溶液の表面張力の測定
# Measurement of the surface activity of aqueous solution of sodium cholate by Wilhelmy method

○島 元啓、水川 雄揮（石川県立大生物資源）
○Motohiro SHIMA, Yuki Mizukawa (Ishikawa Prefectural Univ.)

胆汁酸は主として消化において消化粥成分の乳化作用を持つ界面活性剤であり、肝臓でコレステロールから生合成され、末端に位置するカルボン酸とグリシンあるいはタウリンがアミド結合した抱合体を形成して胆嚢に貯蔵される。消化の際には、十二指腸から胆汁の成分として放出されて、油脂やタンパク質等の疎水性物質の乳化により消化を促進している。その多くは、小腸で再び体内に吸収されて再利用され、その流れは腸管循環と呼ばれている。

胆汁酸はステロイド骨格に 1 個から数個の水酸基と 1 個のカルボキシル基が結合した構造を有し、主要な胆汁酸では平面状の骨格の片側に親水性の官能基が集まる特異な形状を有する。胆汁酸の主要な成分であるコール酸のナトリウム塩を図に示す。

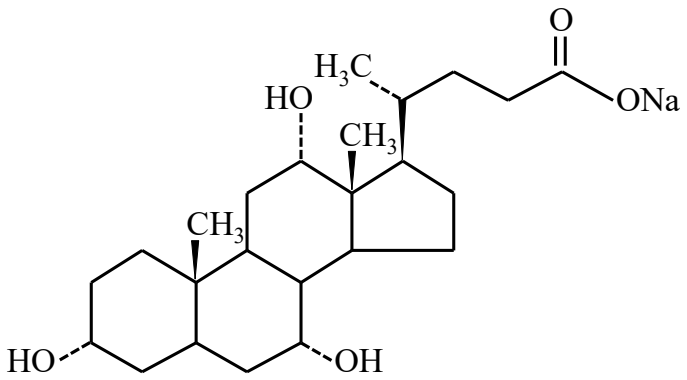



図. コール酸ナトリウム

この構造から、水溶液中では疎水面を向かい合わせにした会合数の少ないミセルの構造が提案されている。その結果、炭化水素鎖を疎水鎖として持つ一般的な界面活性剤と異なり、臨界ミセル濃度を特定の値で定めにくい特徴を有するとされる。

そこで本研究では、Wilhelmy 法を用いてコール酸ナトリウム水溶液の臨界ミセル濃度近傍の表面張力を測定し、臨界ミセル濃度近傍の表面張力の変化を観察した。測定の結果、10 mol/L と 20 mol/L の近傍に屈曲点を有する表面張力の濃度依存性が観察された。

Sodium cholate, Wilhelmy method, Surface activity

発表責任者：島 元啓（shima@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：2A05p06
講演日時：3 月 18 日 15:25～ A 校舎 05 会場

# 透析膜中の拡散速度解析による水溶性食物繊維へのグルコース結合量の評価法

# Evaluation of the amount of glucose adsorbed on soluble dietary fibers by the analysis of its diffusion rate through dialysis membrane

○中村 華恵[1]、稲 成信[3]、赤尾 真[2,3]、熊谷 日登美[2,3]、熊谷 仁[1] ([1]共立女子家政、[2]日大生物資源科学、[3]日大院生物資源科学)
○ Hanae NAKAMURA[1], Sigenobu INA[3], Makoto AKAO[2,3], Hitomi KUMAGAI[2,3], Hitoshi KUMAGAI[1] ([1]Kyoritsu Women's Univ., [2]Nihon Univ., [3]Grad Sch. Nihon Univ.)

【目的】食物繊維の摂取が食後の血糖値上昇を抑制することは広く知られており、そのメカニズムは、食物繊維による糖の吸着に起因していると考えられている。食品科学では、Ou らが提唱した透析システムを用いる方法[1)]によって、膜中のグルコースの拡散速度の差を測定し、食物繊維へのグルコースの吸着量についての定性的な比較がなされている。本研究では、Ou らの方法によって得られる結果に、膜中のグルコースの拡散方程式を適用することにより、食物繊維へのグルコースの見かけの吸着量の算出を試みた。

【方法】試料としては、水溶性食物繊維である Carboxy methyl cellulose (CMC)、Guar gum、Xanthan gum、β–Glucane を用いた。また、食物繊維と同様のグルコース吸着能があることが報告されている米アルブミン[2)]を用いた。透析ユニットを用いたグルコースの拡散実験では、分画分子量 3500 の透析膜が装着された透析ユニットを用いた。その上部チャンバーに食物繊維とグルコースを含む溶液を下部チャンバーに水を入れて 37℃の振とう恒温槽中でインキュベートした。振とう開始から 30 分ごとに 150 分まで、下部チャンバーの溶液を採取し、グルコース定量キットを用いて下部チャンバー中のグルコース濃度を測定した。食物繊維へのグルコース吸着量の解析は、構築した膜中のグルコースの拡散方程式を用いて行った。コントロールとして、グルコース水溶液を上部チャンバー入れた拡散実験を行い、下部チャンバーのグルコース濃度 $C_2$ の経時変化のデータを拡散方程式に fitting して、透析膜中のグルコースの拡散係数 $D$ を求めた。次いで、食物繊維を含むグルコース水溶液を上部チャンバーに入れて拡散実験を行い、$C_2$ の経時変化と mass balance から、上部チャンバー中のグルコース濃度 $C_1$ を計算し、その値から食物繊維へのグルコースの見かけの吸着量を求めた。

【結果】$C_2$ の経時変化は、構築した膜中のグルコース拡散方程式により良好に回帰できた。また、$C_1$ の計算値を用いて、CMC、Guar gum、Xanthan gum、β–Glucane、米アルブミンへのグルコースの見かけ吸着量を算出することができた。

【参考文献】

1) Ou, *et al.*, *In Vitro* Study of Possible Role of Dietary Fiber in Lowering Postprandial Serum Glucose, *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 1026−1029 (2001)
2) Ina, *et al.*, Rice (*Oryza sativa japonica*) Albumin Suppresses the Elevation of Blood Glucose and Plasma Insulin Levels after Oral Glucose Loading, *J. Agric. Food Chem.*, **64** , 4882-4890 (2016)

Dietary fiber, Glucose, Adsorption

発表責任者：熊谷仁（kumagai@kyoritsu-wu.ac.jp）

講演番号：2A05p07
講演日時：3 月 18 日 15:40～ A 校舎 05 会場

# LC/MS を用いたβ-リパーゼ阻害活性試験法

β-lipase inhibitory activity assay using LC/MS

○大木 伽耶子、隅谷 栄伸（公益財団法人　東洋食品研究所）
○Kayako OGI, Hidenobu SUMITANI (Toyo Institute of Food Technology)

【目的】

β-リパーゼは中性脂肪(トリグリセリド)のエステル結合を加水分解する酵素である。その働きを阻害することで体内への脂肪吸収を抑えられることから、阻害活性を有する食品が求められている。一般に阻害活性試験は、蛍光標識を持つエステル化合物(4-methylumbelliferyl oleate)を加えた食品試料中で酵素反応させた際の 4-methylumbelliferon(4-MU)の生成量を蛍光測定し、阻害率を計算している。我々はこの手法を用いて柑橘果皮水抽出物のβ-リパーゼ阻害活性評価を試みていたが、試料由来成分の蛍光が非常に大きく、値が不正確になっている可能性が示された。そこで本研究では、LC/MS により 4-MU を直接定量することで、β-リパーゼの阻害率を計算する手法を検討した。

【方法】

LC/MS 法を検討するため、次の 3 つの項目について試験を行った。(1)LC/MS での 4-MU 検出条件：4-MU 標品水溶液を用いて、感度良く 4-MU を検出できる LC/MS 条件(ネガティブ／ポジティブ検出、カラムなど)を検討した。(2)LC/MS 法による 4-MU の検量直線性：4-MU 標品水溶液(0.01, 0.1, 1ppm)を調製し、蛍光法と LC/MS 法で検量線を作成、比較を行った。(3)実試料における蛍光法との比較：試料として既知β-リパーゼ阻害物質であるカテキン水溶液(10, 30, 50ppm)および柑橘果皮水抽出物を用いて試験を行い、蛍光法と LC/MS 法での阻害率を比較した。柑橘果皮水抽出物は 7 種の柑橘(レモン、ゆず、すだち、かぼす、グレープフルーツ、オレンジ、みかん)の凍結乾燥果皮各 15mg を 1.5ml の超純水で抽出したものを試料とした。

【結果】

(1)4-MU は、ネガティブイオンモードで逆相カラムを用いることで感度良く検出されることを確かめた。(2)検量直線性は 0.01～1ppm の範囲内で蛍光法と LC/MS 法で同等であった。(3)カテキンを用いた試験では、両方の手法で同程度の阻害率が観測された。柑橘果皮水抽出物を用いた試験では、ゆず・すだちでは蛍光法と LC/MS 法で同程度の阻害率が得られた一方、レモンなどいくつかの試料では LC/MS 法で蛍光法よりも低い阻害率が算出された。この結果は、蛍光を持つ試料において蛍光法ではβ-リパーゼ阻害率が過大評価される可能性を示しており、LC/MS を用いたβ-リパーゼ阻害活性試験の有用性を示唆した。

lipase inhibitor, LC/MS, citrus peel

講演番号：2A05p08
講演日時：3 月 18 日 15:55～ A 校舎 05 会場

# 自己駆動型クーロメトリーを用いた日本酒モロミ中のピルビン酸およびグルコース定量

# Determination of pyruvate and glucose in sake moromi using self-driven bio-coulometry

○緒方 七海、羽様 晃司、北村 誠、三木 功次郎 (奈良高専)
○Nanami OGATA, Koji HAZAMA, Makoto KITAMURA, Kojiro MIKI (Nara Natl. Col. Tech.)

【目的】クーロメトリーは，電解反応によって流れた電気量を測定することで目的物質の絶対量を測定できる方法である。さらに，作用極に注入した試料物質と対極に含まれる電池活物質との酸化還元電位の差を駆動力として，電池と同様に自発的に放電電流を発生させ，電解に電源を必要とせずに測定ができる自己駆動型クーロメトリー法が報告されている[1)]。本研究では，この自己駆動型クーロメトリーを用いたグルコースおよびピルビン酸定量の検討を行い，日本酒モロミ中のグルコース，ピルビン酸の測定を行った。

【実験】アクリル樹脂性の透析セルを加工してクーロメトリックセルとして用い，作用極（カーボンフェルト，約5 $cm^3$）と対極（カーボンフェルト，約5 $cm^3$）を陽イオン交換膜で隔てた。作用極にはリン酸緩衝液，対極には被還元物質として0.45 M $K_3[Fe(CN)_6]$を含むリン酸緩衝液（pH 6.0）をそれぞれ含浸させた。作用極と対極の間に抵抗を接続して，デジタルボルトメーターを用いて電流を測定した。ピルビン酸測定には乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH）およびジアホラーゼ（DI），グルコース測定にはグルコースデヒドロゲナーゼ（GDH）を用いた。また，ジアホラーゼおよびグルコースデヒドロゲナーゼの電子受容体として2,3-ジメトキシ-5-メチル-*p* -ベンゾキノン（$UQ_0$）を用いた。

【結果・考察】$UQ_0$を含むDI溶液にNADHを添加して，37℃で一定時間反応させた。酵素反応が終了した溶液をクーロメトリックセルに10 µL添加した。ジアホラーゼによるNADHの酸化反応に伴い生成する還元型$UQ_0$と$[Fe(CN)_6]^{3-}$の酸化還元電位の差による自己駆動により流れた電解電流より，電気量およびNADH濃度を算出した。得られたNADH濃度は吸光度より求めたNADH濃度とよく一致した。ピルビン酸溶液にLDHを添加して，LDHの酵素反応で減少したNADH量を本法で測定することにより，ピルビン酸濃度を測定することができた。測定に要する時間は約15分であった。本法で日本酒モロミ中のピルビン酸を測定したところ，吸光度法による測定とよく一致した。また，GDHを用いた日本酒モロミ中のグルコース測定も良好な結果が得られた。本法は濁度の影響を受けないため，日本酒モロミをろ過することなくそのまま測定が可能であり，迅速・簡便・安価な測定法として期待できる。

1）内山俊一 編，高精度基準分析法クーロメトリーの基礎と応用，学会出版センター，1998

coulometry, glucose, pyruvate

講演番号：2A05p09
講演日時：3 月 18 日 16:10～ A 校舎 05 会場

# 親水性クロマトグラフィーと高分解能質量分析によるジペプチドの網羅解析

# A Comprehensive Analysis of Dipeptide Based on Hydrophilic Interaction Chromatography and High-resolution Mass Spectrometry

○佐藤 大[1]、倉林 篤史[1]、大日向 耕作[2]、鈴木 秀幸[1] ([1]かずさ DNA 研究所・バイオ研究開発部、[2]京大院農食品生物)
○ Masaru SATO[1], Atsushi KURABAYASHI[1], Kousaku OHINATA[2], Hideyuki SUZUKI[1] ([1]Department of Research & Development, Kazusa DNA Research Institute, [2]Division of Food Science and Biotechnology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

【目的】タンパク質の加水分解によって生成するジペプチドは、食品中での生理活性や呈味性など食品の高機能化に関わる機能性を有している。これらの機能性は単独のジペプチドの効果だけでなく複数のジペプチドの相乗的な効果である場合があり、機能性の解析にはジペプチドを網羅的に検出・同定する分析手法が必要となる。そこで本研究ではそこで本研究では市販ジペプチドライブラリーを用いて、LC-MS による分析手法とジペプチド配列の同定手法の開発を検討した。
【方法】ライブラリーのジペプチドは、質量数が重複しないよう 18 のグループに分割し、それぞれのグループの混合溶液として分析した。LC では Inertsil Amide カラム（GL-Science）と水・アセトニトリル・ギ酸溶媒系による親水性クロマトグラフィー（HILIC）を行った。MS には高分解能質量分析計 Q Exactive（Thermo Fisher Scientific）を用い、フルスキャンと合わせて High-energy collisional dissociation による MS/MS スペクトルを収集した。
【結果】分析に供した 334 種類のジペプチドのうち、293 種類についてクロマトグラム上で単独ピークを検出し、MS/MS スペクトルを収集した。HILIC でのジペプチドの保持と分離は良好であり、構成アミノ酸残基から計算された疎水性度と保持時間には相関があった。また、測定された精密質量は誤差 3 ppm 以内で理論精密質量と一致しており、分子量 1,000 までのペプチドの精密質量データベースを照合することで、ジペプチドの構成アミノ酸組成を絞り込むことが可能であった。配列同定に必要となる MS/MS スペクトルからは、塩基性残基（Lys、Arg、His）を含まないジペプチドの場合に、ペプチドの理論フラグメントイオン系列の中でも $y_1$-イオンが優先的に生成することが明らかになった。一方、塩基性残基を含むジペプチドの場合、a、b、c、および x、y、z のいずれのイオン系列にも当てはまらないものの、強度が大きく特徴的なフラグメントが生成していることが確認された。さらに、Lys 残基を含むジペプチドの場合では、当該フラグメントと $b_1$-イオンに相当するフラグメントの強度比が、Lys 残基の位置によって有意に異なることが明らかとなった。同様に Arg と His 残基を含むジペプチドでは、当該フラグメントと $y_1$-イオンに相当するフラグメントの強度比が塩基性残基の位置によって有意に異なっていた。これらのフラグメント生成の特徴を利用すると、LC-MS の分析データから多くのジペプチドについて配列まで決定することが可能であった。このことから、本分析法によって標準試料の分析結果に依存しないジペプチドの網羅的な検出と同定が可能になるものと期待される。

本研究は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業を活用して実施した。

Dipeptide, Hydrophilic Interaction chromatography, High-resolution mass spectrometry

発表責任者：鈴木秀幸（hsuzuki@kazusa.or.jp）

講演番号：2A05p10
講演日時：3 月 18 日 16:25～ A 校舎 05 会場

# $^{1}$H-NMR メタボローム解析を用いた玄米米糠麹（FBRA）の品質評価に関する基礎的検討

Studies on the quality control of fermented brown rice and rice bran with *Aspergillus oryzae* by metabolome analysis using $^{1}$H-NMR

○堀江 裕紀子[1]、根本 英幸[1]、池川 繁男[2]、熊木 康裕[3]、大西 裕季[3]、久米田 博之[3,4]、出村 誠[3,4]、相沢 智康[3,4]（[1]（株）コーケン、[2]（株）玄米酵素、[3]北大院・生命科学、[4]北大・GI-CoRE ソフトマターGS）

○ Yukiko HORIE[1], Hideyuki NEMOTO[1], Shigeo IKEGAWA[2], Yasuhiro KUMAKI[3], Yuki OHNISHI[3], Hiroyuki KUMETA[3,4], Makoto DEMURA[3,4], Tomoyasu AIZAWA[3,4] ([1]Koken Co., Ltd., [2]Genmai Koso Co., Ltd., [3]Grad. Sch. Life Sci. Hokkaido Univ., [4]Soft Matter GS, GI-CoRE Hokkaido Univ.)

【目的】玄米米糠麹（Fermented brown rice and rice bran with *Aspergillus oryzae*: FBRA）は、玄米と糠を麹菌によって発酵させ、玄米の乏しい消化能の改善と糠に豊富に含まれる栄養素や機能性成分の手軽な摂取を可能とした健康補助食品である。しかしながら、機能性成分は稲の生育環境、保存状態のみならず、発酵条件など、様々な要因によって質的・量的に大きく変動する可能性のあることが推測される。このため、一定の品質を維持した完成した商品として FBRA を提供する上で、科学的根拠に基づいた信頼度の高い検査法で FBRA の成分を把握し、品質管理を徹底することが重要な課題となる。こうした観点から、先に我々はポストカラム検出高速液体クロマトグラフィーによるアミノ酸の一斉分析による品質管理法について報告した。今回、食品の真正評価や品質評価に核磁気共鳴(NMR)法による網羅的代謝物解析法が威力を発揮することから、$^{1}$H-NMR 法による多変量解析を用いた FBRA の品質評価法を検討した。

【実験】5 機の発酵機を用いて製造された FBRA を適量秤量し、1mM の 3-(トリメチルシリル)-1-プロパンスルホン酸ナトリウム(DSS)を含む容積比 10 倍量の 0.1M のリン酸緩衝液（pD=6.9）を加えて 4℃で終夜撹拌または 30 分間激しく振盪し、遠心分離(18000×g、10 分)後の上清を NMR 試験管に封入した。装置には Bruker Avance III HD を用いて $^{1}$H-NMR スペクトルを測定した。スペクトルの解析には Chenomx NMR Suite 8.2、主成分分析には SIMCA 14.0 を用いた。規格化は DSS の積分値を用いた。

【結果・考察】5 機の発酵機を用いて製造した FBRA の主成分分析では発酵機毎の偏りは見られなかった。原料の成分のばらつきは発酵後の FBRA の成分には大きく影響しないことが分かった。第 1 主成分は、発酵の度合いを表す指標として用いることができると考えられ、ローディングプロットから第 1 主成分に大きく寄与しているのはグルコース由来の化学シフトであることが示された。このことから、FBRA の水溶性抽出成分の $^{1}$H-NMR スペクトルを主成分分析することで品質管理が可能なことが分かった。現在さらに、$^{1}$H-NMR スペクトルと黄麹菌から分泌される消化酵素であるα-アミラーゼ活性の PLS 回帰分析とともに、OPLS 判別分析による発酵機や製造ロット間での成分のばらつきを精査している。

fermented food, NMR, metabolome analysis

発表責任者：堀江裕紀子（horie@genmaikoso.co.jp）

講演番号：2A05p11
講演日時：3 月 18 日 16:50～ A 校舎 05 会場

# $^{31}$P NMR を用いた卵黄変性の動的構造解析

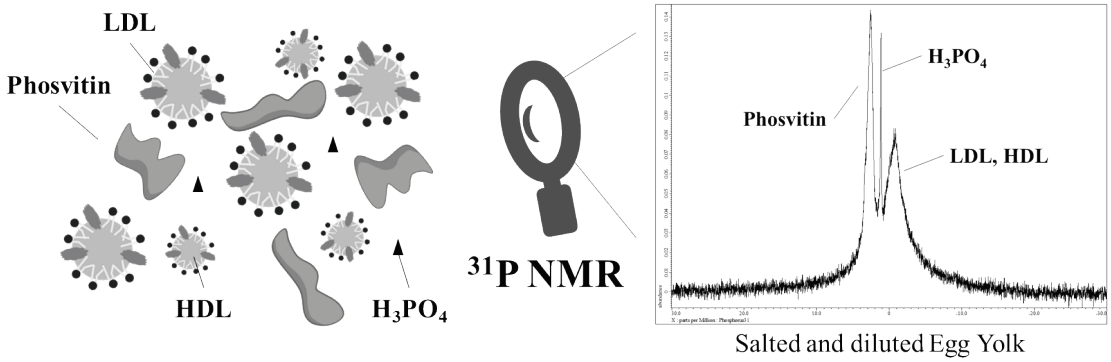
# Dynamic Structure Analysis of Egg Yolk Denaturation with Phosphorus-31 Nuclear Magnetic Resonance

○若松 弘起[1]、半田 明弘[2]、千葉 一裕[1]([1]東農工大院農、[2]キユーピー（株）研究開発本部)
○Hiroki Wakamatsu[1], Akihiro Handa[2], Kazuhiro Chiba[1] ([1]Dept. Appl. Bio. Sci., Tokyo Univ. of Agric. and Tech., [2]R&D Div., Kewpie Corp.)

**【緒言】**卵黄は，脂質やタンパク質から成る複雑な構造をもつ．卵黄の構造と乳化やゲル化などの機能性は深く関わっており，特にリン脂質とタンパク質の相互作用は重要な因子である．そのため，それらの相互作用を評価し制御する様々な方法が開発されてきた．$^{31}$P NMR は，リン脂質の動的状態を非破壊で解析することができる有用な手法である．今までに，水中油（O/W）型におけるリン脂質の動的挙動やリン脂質とタンパク質の相互作用などが報告されてきた．本研究では，$^{31}$P NMR の手法を複雑な構造をもつ卵黄の動的構造解析へと応用することを目的とした．

**【方法および結果】**

純卵黄と加塩卵黄（NaCl 1.71 mol L-1）を，日本電子製 NMR（ECA-600）により 243.0 MHz（プロトンデカップル 600.2 MHz）で測定した．その結果，純卵黄では，ブロードなピークに重なった鋭いピークが観察され，加塩卵黄では，3 つに分離されたピークが観察された．加塩によるピーク変化は，グラニュールの崩壊が関連していると推測された．そこで，希釈と遠心分離によりプラズマとグラニュールを調製し，それぞれの成分を， 無塩および加塩状態（NaCl 1.71 mol $L^{-1}$）で測定を行った．期待した通り，グラニュールのみにおいて加塩によるピーク変化が観察された．続いて，リン酸やホスビチン，LDL を用いて，それぞれのピーク同定を行った．さらに凍結解凍によるリン脂質の構造変化を $^{31}$P NMR のピーク変化として検出することに成功した．特にプラズマでのピーク変化が顕著であり，プラズマがグラニュールより凍結解凍の影響を受けやすいことを $^{31}$P NMR を用いて確認することに成功した．




$^{31}$ NMR, Egg yolk, Denaturation

講演番号：2A05p12
講演日時：3 月 18 日 17:05～ A 校舎 05 会場

# 岐阜県内トウゲシバにおける産地・季節間の huperzineA 含量の比較

# Regional and seasonal variations in huperzine A content of Huperzia serrata harvested in Gifu

○川合 美有紀[1]、加藤 拓也[2]、原 英彰[3]、大山 雅義[3]、河野 宏行[2]、横山 慎一郎[1]([1]岐阜産技セ、[2]アピ（株）、[3]岐薬大)
○Miyuki KAWAI[1], Takuya KATO[2], Hideaki HARA[3], Masayoshi OYAMA[3], Hiroyuki KONO[2], Shin-ichiro YOKOYAMA[1] ([1]Industr. Tech. Center,Gifu, [2]Api Co.Ltd, [3]Gifu Pharm. Univ)

【目的】
民間薬として用いられるトウゲシバに含まれる Huperzine A には、アセチルコリンエステラーゼ阻害作用や NMDA 型グルタミン酸受容体阻害作用による認知症予防効果が認められている。トウゲシバ群生地は全国各地に分布しており、おかれた気候も多様であることから、産地間および採取季節間による Huperzine A 含量にも違いがあることが想定される。本研究では、岐阜県内産トウゲシバの機能性食品素材としての活用を目的に、実用的な Huperzine A 抽出法の確立を行うとともに、県内 4 地域のトウゲシバの、産地間および採取季節間における Huperzine A 含量の違いについて調査を行った。
【実験方法】
Huperzine A 抽出条件として、トウゲシバ乾燥粉末からの熱水抽出およびエタノール抽出を試みた。抽出液を遠心分離後、その上清を Sep-Pak QMA カートリッジ（日本ウォーターズ製）にて前処理し、逆相カラム（Mightysil RP-18、関東化学製）を用いた HPLC にて 308nm で検出した。採取地は、県内でも群生量の多い 4 地域（揖斐川町、高山市、山県市、関市）とし、採取時期は春（4 月下旬-6 月初旬)、夏（8 月)、秋（11 月）の 3 回とした。
【結果および考察】
抽出条件検討の結果、熱水抽出（90℃、3 時間）がエタノール抽出（50%、3 時間）と遜色なかったことから、以降は熱水抽出とすることとした。抽出回数検討の結果、抽出 2 度目において 1 度目の約 1/2 量の Huperzine A が回収されたが、3 度目以降は検出限度以下であったため、抽出は 2 度行うこととした。トウゲシバ絶乾葉 1g 当たりの Huperzine A 含量（mg/gDW）は、揖斐川町で 0.15-0.28、高山市で 0.04-0.08、山県市で 0.12-0.19、関市で 0.36-0.49 と大きな違いがみられた。揖斐川町以外の 3 地域において、春と夏では Huperzine A 含量に差異はみられなかった。山県市と関市では秋に約 1.5 倍程度増加がみられたものの、高山市ではやや減少していた。一方揖斐川町においては、季節間における大きなばらつきが認められた。形態観察より、高山市および山県市ではホソバトウゲシバが、関市ではヒロハノトウゲシバが優勢であったが、揖斐川町では混在していた。揖斐川町で 11 月に採取したホソバとヒロハの Huperzine A 含量の分析の結果、ホソバが 0.21 mg/gDW であったのに対し、ヒロハは 0.50 mg/gDW と約 2.4 倍多く含まれていた。以上の結果より、揖斐川町における季節間 Huperzine A 含量の差異は、検体中のヒロハとホソバの混在割合に起因するものと考えられた。

Huperzia serrata, huperzine A, reagional and seasonal variations

発表責任者：横山　慎一郎（yokoyama-shinichiro@pref.gifu.lg.jp）

講演番号：2A05p13
講演日時：3 月 18 日 17:20～ A 校舎 05 会場

# オリーブの花より分離した耐塩性酵母で醸造した醤油の特徴
# Characteristics of Soy Sauce Fermented with Halo-tolerant Yeast Isolated from Olive Flower

○大西 茂彦[1]、浅井 貴子[2]、松井 幸一[3]([1]香川産技セ発食、[2]香川産技セ食研、[3]株式会社ヤマヒサ)
○Shigehiko OHNISHI[1], Takako ASAI[2], Kouichi MATSUI[3] ([1]Kagawa ITCFF, [2]Kagawa ITCFR, [3]Yamahisa Inc.)

## 【目　的】

花醤(はなびしお)は、オリーブの花より分離した耐塩性酵母 *Zygosaccharomyces sapae*(オリーブ花酵母)を利用して香川県小豆島の醤油メーカーが醸造したこいくち醤油である。花醤は、官能検査で従来のこいくち醤油と比較して「独特の甘みがあり、塩味を感じにくい味」と評価されている。この味の特徴を形成している成分の解明を目的に、花醤と通常のこいくち醤油の水溶性低分子化合物をガスクロマトグラフ質量分析計（GC-MS）で一斉分析してメタボローム解析し、両者の比較を行った。

## 【方　法】

花醤と市販の本醸造こいくち醤油３製品(大豆、小麦、食塩、アルコールのみを原料としている)を実験に用いた。醤油に含まれる水溶性低分子化合物は、抽出、脱脂および除たんぱく操作の後にトリメチルシリル化して GC-MS 分析に供した。GC-MS の分析データはクロマトグラフデータ前処理ソフトウェア「MetAlign」でピークアライメント後、大阪大学大学院工学研究科のインハウスソフトウェア「AIoutput 1.29」で化合物の同定、相対定量および多変量解析を行った。

## 【結　果】

花醤を含むこいくち醤油４製品の水溶性低分子化合物を GC-MS で一斉分析したところ、42 成分が検出・同定された。４製品の分析データを主成分分析に供してスコアプロットを作成したところ、花醤は分析した他のこいくち醤油とは違う位置にプロットされ、花醤の水溶性低分子化合物の組成が他の醤油と比較して大きく異なることが明らかとなった。

次に、花醤に特徴的な化合物を検討した結果、ぶどう糖、ガラクトースおよびアラビノースが他のこいくち醤油の約２倍含まれていることが明らかとなった。これら甘味を有する糖類は通常の醤油にも含まれているが、花醤はこれらの糖類が多く含まれていることにより甘味が強く感じられるとともに塩味がマスキングされていると考えられた。一方、醤油中の主要な糖アルコールであるグリセロール含量は、花醤の方が他の醤油より低い傾向にあった。

醤油中にぶどう糖などの単糖が多く残存する場合、酵母によるアルコール発酵が不十分なことが疑われる。花醤は原料としてアルコールを使用していないが、発酵により２％以上のアルコールが含まれており、この可能性は否定された。オリーブ花酵母が糖類を残しつつ正常なアルコール量を生産するメカニズムについても考察を行った。

Halo-tolerant Yeast, Soy Sauce, Olive Flower

発表責任者：大西茂彦（ky2556@pref.kagawa.lg.jp）

講演番号：2A05p14
講演日時：3 月 18 日 17:35～ A 校舎 05 会場

NMR によるシイタケ生理活性成分の抽出法の影響について
Effect on the extraction methods of Shiitake-bioactive compounds by NMR spectroscopy
○中川 克彦[1]、井下 章子[1]、藤信 幸美[1]、堤 主計[1]、間淵 通昭[1]、早瀬 伸樹[1]、森永 弘志[2]、宮部 慎司[2] ([1]新居浜高専、[2](株)大愛)
○ Katsuhiko NAKAGAWA[1], Akiko INOSHITA[1], Yukimi FUJISHIN[1], Chikara TSUTSUMI[1], Michiaki MABUCHI[1], Nobuki HAYASE[1], Hiroshi MORINAGA[2], Shingi MIYABE[2] ([1]Niihama NCT, [2]Daiai Co.,Ltd.)

【目的】
日本では様々な種類のキノコが栽培され、それらの中でシイタケは原木栽培に加え菌床栽培がおこなわれるようになり、さらに 80 年代の終わりから中国産などを中心とした安価な輸入品が増加したことから、食される機会が多いキノコの一つである。本研究では、国内産シイタケの栽培法、調理法の違いによる、血中コレステロール低下作用を有するエリタデニン(Er)やマンニトール(Man)などの生理活性成分およびグアノシン一リン酸(5'-GMP)などの旨味成分などの抽出率の差違について、簡易に分析できる方法として、核磁気共鳴(NMR)を用いた。NMR は、シイタケからの抽出成分を分離せずに非破壊的に測定を行い、スペクトル再現性が高く、試料溶液の回収ができるなどの NMR 法の長所を活かし、シイタケの生理活性成分を解析し、他の分析法として LC-qTof/MS と比較検討したので報告する。
【方法および結果】
市販の生および乾燥シイタケ(菌床、原木)を使用し、抽出前後のシイタケの形態観察はレーザー顕微鏡などに行った。冷水、加熱水などの種々の抽出法により得られた水抽出液について、免疫賦活作用を有する β-Glucan の含有量は Congo Red と β-1,3-1,6-Glucan との錯体形成量を UV スペクトルにより算出した。 一方、水抽出成分の構造解析するため、$^{1}$H-NMR、LC-Qtof/MS、Laser Raman 等を、生理活性成分の含有率を求めるため、Er、Man などの標準物質を用いて検量線を作製した。
シイタケより水抽出した溶液に含まれる $\beta$-1,3-1,6-Glucan の含有量は、原木、菌床による差違は見られなかった。一方、水抽出溶液の $^{1}$H-NMR スペクトルでは、軽水溶媒シグナルの消去法として、WET 法（water suppression enhanced through T1 effect）を用いて効率的に溶媒消去を行なうため、フリップアングルを調節した選択励起パルスを用いて測定した結果、$\beta$-1,3-1,6-Glucan の定性は困難であったが、各種の糖、糖アルコール、有機酸、アミノ酸などを定性、定量することができた。 その結果より、生理活性成分である Er は、冷水で一晩浸漬した後、50、60℃で 25～50 分加熱処理すると、最も増加することを見出した。また、栽培方法で比較すると、菌床シイタケの Er 成分量は原木シイタケより高いことが示唆された。 さらに、生シイタケの保存期間、乾燥シイタケの作製方法による抽出溶液中の生理活性成分などの含有量について報告する。

Lentinus edodes, bioactive compounds, NMR

発表責任者：中川克彦（nakagawa@chem.niihama-nct.ac.jp）

講演番号：2A05p15
講演日時：3 月 18 日 17:50～ A 校舎 05 会場

# 各種玄米に対する湿熱処理条件が及ぼす玄米中成分への影響

# Effect of heat-moisture-treatment to brown rice on compornent and total microbial counts

○春日 景太[1]、榎 康明[2]、最上 真鈴[1]、奥村 寿子[1]、菅原 正義[1] ([1]長岡高専、[2]ブルボン)
○Keita Kasuga[1], Yasuaki Enoki[2], Marin Mogami[1], Hisako Okumura[1], Masayosi Sugawara[1] ([1]NCT, Nagaoka, [2]Bourbon)

【目的】

世界的に消費されているグルテンフリー食品・ホールフード食品素材として、農水省「革新的技術開発・緊急展開事業(うち地域戦略プロジェクト)」実証研究型において、現在、玄米を製粉した玄米米粉の開発研究を実施している。保存性が高く欧米の食品基準に受け入れられる米粉の大量生産技術開発において、玄米の微生物汚染やリポキシゲナーゼやリパーゼなど脂質酸化による品質低下に関与する酵素活性が大きな解決すべき課題である。今回は玄米に湿熱処理を行い、殺菌と酵素失活することを目的として、処理条件の検討を行った。湿熱処理とは、デンプン糊化に不十分な低水分条件下でデンプン質食品素材を飽和水蒸気で加熱する方法で、デンプンは糊化しないが、デンプン粒内水素結合形成により結晶化度が上がりデンプンの性質を改変することができ、安全でクリーンラベル食品に適合した加工法である。本研究では、高アミロース米玄米に湿熱処理を行い、菌数、酵素活性、難消化性成分に及ぼす影響を検討した。

【方法】

高アミロース米品種越のかおり玄米に、0，0.1，0.2，0.3 MPa、0，2，5，10 分間の湿熱処理を行った。湿熱処理は、玄米 500 g を入れたステンレス製ざるを耐圧容器内に入れ、アスピレーターで減圧後、貫流ボイラーから所定圧力の蒸気を入れ、所定処理時間後大気圧に減圧した。この、湿熱処理によって 15 %の玄米水分は、処理後、最大 17 %になった。湿熱処理後、粉砕前の玄米を標準寒天平板培地により一般細菌数を測定、粉砕粉末のβ-アミラーゼ・プルラナーゼ法による糊化度、難消化性デンプン含量、食物繊維含量、リパーゼ・リポキシゲナーゼ活性、玄米吸水率を測定した。

【結果】

玄米付着菌数は、0.2 MPa，0.3 MPa、2 分間、0.1 MPa、5 分間処理により検出限界以下（200 cfu/g）に低下した。また、湿熱処理によって、リポキシゲナーゼ、リパーゼ活性共に蒸気圧力、処理時間に依存して低下し、0.3 MPa、10 分間では、未処理玄米活性の 80%に低下した。糊化度（熱損傷度）は、蒸気圧力、処理時間に依存して上昇し、難消化性デンプン含量、食物繊維含量も増加した。また、湿熱処理により玄米の吸水率が増大し、特に 0.3 MPa、10 分間処理では、白米の吸水率と同程度となった。

brown rice, heat-moisture-treatment, sterilization

発表責任者：菅原正義（suga@nagaoka-ct.ac.jp）

講演番号：2A06a01
講演日時：3 月 18 日 09:20～ A 校舎 06 会場

# 認知機能低下を軽減するロスマリン酸の効果

# The effect of Rosmarinic acid on reducing the cognitive function.

○山下 玲[1]、長谷 知輝[1]、浜口 毅[2]、篠原 もえ子[2]、山田 正仁[2]、阿部 啓子[1,3]、小林 彰子[1] ([1]東大院農、[2]金沢大医、[3]神奈川科学技術アカデミー)
○Rei YAMASHITA[1], Tomoki HASE[1], Tsuyoshi Hamaguchi[2], Moeko SHINOHARA[2], Masahito YAMADA[2], Keiko ABE[1,3], Syoko KOBAYASHI[1] ([1]UTokyo, [2]Kanazawa Univ., [3]KAST)

【背景・目的】
ポリフェノールを摂取する食習慣がアルツハイマー病予防に繋がるという疫学的知見が多く報告されているが、因果関係の証拠は得られていない。我々は *in vitro* と *in vivo* で、ロスマリン酸（RA）が高いアミロイドβタンパク質（Aβ）凝集抑制を示すことを見出している（Ono et al., *J Neurosci Res.* 2004, Hamaguchi T et al., *Am J Pathol.* 2009）。RA 摂食により脳内 Aβ 沈着が抑制された Tg2576 マウス脳の DNA マイクロアレイ解析により、RA 群の脳では細胞死やグルタミン酸受容体の抑制、および Aβ 凝集抑制活性をもつモノアミン類の分解抑制が示唆された（宍戸ら、2016 年度農芸化学会）。本研究では、これらの遺伝子変化が RA 摂食によるものか Aβ 凝集抑制によるものかを検証する為に、Tg2576 および野生型（WT）マウスを飼育し、トランスクリプトミクスで比較すると共に、行動試験を行い RA 摂食による詳細な認知機能低下抑制効果を明らかにすることを目的とした。
【方法】
既報の浜口らの方法に準じ、3 か月齢の Tg2576 マウス及びその背景系統である WT マウス C57BL/6J をそれぞれ、AIN-93G を基本飼料とした対照群（C 群）、および 0.5% RA 含有 AIN-93G を与えた RA 群の 2 群に分け、12 ヵ月間飼育した。飼育 12 ヶ月後、オープンフィールド試験及び新奇物体認識試験による認知行動試験を行った後に脳を摘出し、Aβ の免疫染色及び DNA マイクロアレイ解析に供した。
【結果・考察】
Tg2576 マウス脳の免疫染色では C 群でも Aβ の顕著な沈着は見られなかった(n=3)。オープンフィールド試験及び新奇物体認識試験において、Tg2576 マウスの C 群は認知機能の低下が示唆されたが、RA 群は WT マウスに近い特性を示し、認知機能低下が抑制されていることが考えられた。Tg2576 マウスは Aβ 沈着よりも先に行動異常が観察されるため、本実験では Aβ 沈着が顕著にみられる前の、認知機能低下の状態であることが考えられた。また、WT マウスの C 群では加齢に伴う体重増加が観察された一方、RA 群は C 群に比べて有意に低体重を示し、加齢に伴う体重増加が抑制されていることが考えられた。これらの RA 摂食による変化と認知機能低下抑制との関連性を解析するため、現在トランスクリプトーム解析を進めている。本研究の一部は、総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」の助成によって実施された。

Rosmarinic acid, Behavioral test, Microarray

講演番号：2A06a02
講演日時：3 月 18 日 09:35～ A 校舎 06 会場

ロスマリン酸による脳内モノアミン変動の解析
Analysis of changes of monoamine in brain by rosmarinic acid
○長谷 知輝[1]、山下 玲[1]、宍戸 駿[1]、豊田 集[1]、濱口 毅[2]、篠原 もえ子[2]、山田 正仁[2]、阿部 啓子[1,3]、小林 彰子[1] ([1]東大院農、[2]金沢大医、[3]神奈川科学技術アカデミー)
○ Tomoki HASE[1], Rei YAMASHITA[1], Shun SHISHIDO[1], Tsudoi TOYODA[1], Tsuyoshi HAMAGUCHI[2], Moeko SHINOHARA[2], Masahito YAMADA[2], Keiko ABE[1,3], Shoko KOBAYASHI[1] ([1]UTokyo, [2]Kanazawa Univ., [3]KAST)

【背景・目的】
我々は、アルツハイマー病(AD)の主病態である脳内アミロイド β タンパク質(Aβ) の沈着を抑制するポリフェノールとして、ロスマリン酸(RA)を見出している。AD モデルマウスである Tg2576 に 10 か月間 RA を経口摂取させると、脳内では Aβ 凝集が抑制されたが、RA は腸管吸収性が低く、腸管上皮細胞を用いた *in vitro* 試験において、腸管吸収率は経口摂取量の約 1%と見積もられている(Konishi et al., *Biosci Biotechnol Biochem*. 2005 )。さらに血液脳関門の存在により、脳内へは到達しにくいことが予測された。一方、Tg2576 マウス脳の DNA マイクロアレイ解析では、RA 群において、Aβ 凝集抑制活性が報告されているカテコールアミン濃度の上昇が示唆された。
そこで本研究では、RA 摂食による Aβ 凝集抑制効果の可能性の一つとして脳内モノアミンに着目し、RA 経口摂取時の体内における RA の局在性および脳内カテコールアミン変動を詳細に解析することを目的とした。
【方法】
Tg2576 マウスの背景系統である C57BL/6J を、AIN93G を与えるコントロール(C)群(n=5)、および AIN93G に 0.5%ロスマリン酸(RA)を混合した(RA)群(n=6)に分けて 11 日間飼育した。11 日後に脳を大脳皮質、海馬、および線条体に分けて採取し、各部位ごとにモノアミン濃度をクーロメトリック式 HPLC-ECD で測定した。C57BL/6J マウスを同様にして、C 群(n=5)、RA 群(n=6)に分け、2 か月間飼育した。2 か月後に消化管を胃、小腸上部、中部、下部、盲腸、および大腸の部位ごとに分けて採取し、上皮をこそげ取り、各部位の上皮における RA 濃度を脳部位と同様の手法で測定した。
【結果・考察】
11 日間 RA を摂食させたマウスでは、大脳皮質において一部のモノアミン濃度が有意に上昇していた。現在、脳内におけるモノアミン上昇メカニズムを探るために、大脳皮質の DNA マイクロアレイを実施している。一方、2 ヶ月間 RA を摂食したマウスにおいては、RA は脳内では検出限界以下であったが、消化管では胃から小腸下部にかけての上皮において高濃度で吸着していた。以上のことから、RA は脳内には到達しにくいが消化管には高濃度で到達していることが明らかとなった。
本研究は、総合科学技術・イノベーション会議の SIP(戦略的イノベーション創造プログラム)「次世代農林水産業創造技術」の助成によって実施された。

Alzheimer disease

講演番号：2A06a03
講演日時：3 月 18 日 09:50～ A 校舎 06 会場

# アミロイドβ誘導性神経細胞死および Tau リン酸化亢進に及ぼす黒米糠抽出物の影響

# Effect of black rice bran extract and its constituents on amyloid beta-induced neuronal cell death and hyperphosphorylation of Tau

○石橋 実学[1]、佐古 秀輝[1]、原 崇[1]、池内 健[2]、城 斗志夫[1]、中村 澄子[4]、西澤 正豊[2]、山﨑 彬[3]、小林 篤[3]、大坪 研一[4]（[1]新潟大農、[2]新潟大脳研、[3]越後製菓、[4]新潟薬大応用生命）
○Mitsuhisa ISHIBASHI[1], Syuki SAKO[1], Takashi HARA[1], Takeshi IKEUCHI[2], Toshio JOH[1], Sumiko NAKAMURA[4], Masatoyo NISHIZAWA[2], Akira YAMAZAKI[3], Atsushi KOBAYASHI[3], Kenichi OHTSUBO[4] ([1]Fac. Agric., Niigata Univ., [2]Brain Res. Inst., Niigata Univ., [3]Echigo Seika Co., Ltd., [4]Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci.)

**【目的】**

演者らは，紫黒米「おくのむらさき」の認知症予防効果を示唆する結果を報告してきた[1)]。本研究では，神経毒性を示すアミロイドβ（Aβ）により誘導される神経細胞死と Tau の過剰リン酸化に対し，「おくのむらさき」糠抽出物とその含有成分であるアントシアニン類（cyanidin，cyanidin-3-O-glucoside）が及ぼす影響について調べた。

**【方法】**

神経細胞モデルとして，ヒトおよびマウスの神経芽細胞腫細胞株（SK-N-SH および Neuro 2a）を用いた。また，Tau のリン酸化について評価する目的で，Neuro 2a 細胞にヒト Tau（4N1R）を安定発現させた Neuro 2a MAPT 細胞を用いた。細胞死は MTT 法，アポトーシスは Annexin V を指標とした FACS 解析，細胞内活性酸素種（ROS）は DCFH を用いた FACS 解析により評価した。Tau およびリン酸化 Tau は，イムノブロット法により検出した。

**【結果及び考察】**

Aβ42を数μM の濃度で培養液に添加すると，SK-N-SH 細胞および Neuro 2a 細胞の細胞死がみられ，細胞内 ROS レベル亢進，アポトーシス誘導を伴うことが確認された。この Aβ42誘導性細胞死に対し，「おくのむらさき」糠抽出物は抑制作用を示した。また，「おくのむらさき」糠の主要色素成分である cyanidin および cyanidin-3-O-glucoside も Aβ42誘導性細胞死を抑制した。一方，Aβ42を添加して Neuro 2a MAPT 細胞を24時間培養すると，細胞死を引き起こす濃度より低い濃度（nM オーダー）において細胞内リン酸化 Tau レベルの亢進が確認された。この細胞内リン酸化 Tau レベルの亢進に対し，「おくのむらさき」糠抽出物，cyanidin および cyanidin-3-O-glucoside は抑制的に作用した。アントシアニン類は，Aβ42誘導性の細胞死および過剰な Tau リン酸化を抑制し，アルツハイマー病の予防効果が期待される。

本研究は，農研機構生研センター革新的技術開発・緊急展開事業「複合機能性を有する高付加価値包装米飯等の開発」の一部として実施した。

1) S. Nakamura et al.:Biosci. Biotechnol. Biochem., (in press) [Published online: 04 Oct 2016]

black rice bran, neuronal cell death, Tau

発表責任者：原　　崇（harata@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：2A06a04
講演日時：3 月 18 日 10:05～ A 校舎 06 会場

# 野菜抽出物の抗アルツハイマー病効果

# The effects of vegetable extracts on anti-Alzheimer's disease

○宮崎 穂菜実[1]、渡辺 みなみ[2]、岡本 遥子[3]、片山 茂[3]、中村 宗一郎[3]、米倉 真一[1,2,3]（[1]信大院総合工、[2]信大農、[3]信大バイオメディカル研）
○Honami MIYAZAKI[1], Minami WATANABE[2], Yoko OKAMOTO[3], Shigeru KATAYAMA[3], Soichiro NAKAMURA[3], Shinichi YONEKURA[1,2,3] ([1]Interdisciplinary Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shinshu Univ., [2]Fac. of Agr., Shinshu Univ., [3]Inst. for Biomed.Sci., Shinshu Univ.)

【背景・目的】アルツハイマー病（Alzheimer's disease: AD）は、言語障害や運動機能の低下、認知機能障害などの症状が現れる神経変性疾患である。このような症状は、脳内における Amyloid-β protein の凝集（老人斑）や神経細胞内における Tau protein の凝集（神経原線維変化）といった病理変化が生じてから 10～20 年を経て発症する。現在、AD の病理変化を標的にする薬が開発されているが、AD 患者の異常なタンパク凝集は減少するものの、認知機能障害を抑制する効果は得られていない。すでに症状が現れている患者に対する治療薬は、未開発であるため、AD は予防が重要になる。ウコンに含まれているクルクミンは黄色を呈しており、Amyloid-β protein の凝集を抑制する効果が認められている。また赤ワインやブドウ皮などに含まれているレスベラトロールは、AD 患者の認知機能を改善する可能性が示唆されている。クルクミンやレスベラトロールは色素に関与した化合物であり、両化合物とも AD に対して抑制効果があることが考えられる。そこで本研究では、色素の濃い食材から、AD 予防効果を持つ化合物の同定を目指すこととした。
【方法・結果】*in vitro* において Aβ 凝集阻害効果を示す食材由来成分を同定するため、Thioflavin T assay を行った結果、小豆抽出物で効果が認められた。次に脳内における Aβ 凝集をはじめ、運動能力の低下や寿命異常、認知機能障害を引き起こす AD モデルバエに小豆抽出物を摂取させ、これらの病理変化や症状が緩和されるのかを検証した。Western Blotting を用いて Aβ 凝集効果を検証した結果、小豆抽出物は Aβ oligomer 形成に対して抑制効果が認められた。さらに小豆抽出物を AD モデルバエに摂取させることで、運動能力低下が遅延すること、そして寿命が延伸することを明らかにした。これらの結果より、小豆抽出物中に抗 AD 病効果をもたらす成分が含まれていることが考えられた。小豆抽出物の活性成分の同定のため、液体クロマトグラフィー質量分析を行った結果、小豆抽出物はカテキン類を含有していることが示された。そこで *in vitro* において Aβ 凝集阻害効果を示すカテキン類を Thioflavin T assay を用いて検証したところ、6 種類のカテキン類で効果が認められた。
【考察・展望】小豆抽出物の摂取によって抗 AD 効果が認められたが、これは Aβ 凝集阻害効果が生じたことによって、運動能力低下の遅延や寿命の延伸といった症状の緩和が起きたのではないかと考えられる。AD は治療が困難であることから、予防が重要である。今後は AD 予防食の開発に向けて、抗 AD 病効果を持つカテキン類の特異的構造を同定することで、その構造を含む食材の探索を行っていく。

Alzheimer's disease, Drosophila, Amyloid

発表責任者：宮崎穂菜実（16st504h@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2A06a05
講演日時：3 月 18 日 10:20～ A 校舎 06 会場

Comparative evaluation of phenolic compounds and neuroprotective activity of cultivar extracts derived from Chrysanthemum morifolium flowers

○Dongjian MA[1], Yutaka WAKOU[2] ([1]Hachinohe IT mecha. & biotech., [2]Hachinohe IT biochem.)

【Purpose】 Aboukyu and Enmeiraku, two cultivars of edible Chrysanthemum have been cultivated in the Northeastern region of Japan. These cultivars are abundantly produced and constitute the major cultivars of edible chrysanthemums in Japan. Chrysanthemum flowers exhibit various significant pharmacological activities including anti-inflammatory activities, and antipyretic effects. In this study, we compared the neuroprotective activity of methanol extracts originated from Aboukyu and Enmeiraku in SH-SY5Y cells, to evaluate their bioactive characteristics in relation with the difference of their phenolic components.

【Materials and Methods】 The powder of chrysanthemum petals were extracted with 80% methanol. Total phenolic compounds were measured by Folin-Denis method. Content of flavonoids were determined by quantitative HPLC analysis. The extracts were analyzed by LC-DAD. For assess the neuroprotective effect of the Chrysanthemum extracts, protective ability against radical oxidant injury was estimated in SH-SY5Y cells treated with the sample. Activation of the Nrf2/HO-1 was evaluated the levels of Nrf2 and HO-1 by immunoblot analysis.

【Results and Discussion】 The extracts from Aboukyu showed higher content of total phenolic compounds (185μmol/g dry weight) compared to Enmeiraku (97μmol/g dry weight) by 2 times. The contents of luteolin (3.24 μmol/g dry weight) and its glucoside were shown to be higher in the extract of Enmeiraku than Aboukyu. Extracts from Emmeiraku prevented t-BOOH-induced cell death in a concentration dependent manner, by contrast, extracts from Aboukyu affected cell viability in a biphasic manner with extract concentrations. At lower concentrations, cell viability was protected from damage, but decreased over the concentrations of extract at 25 μg/ml. Cytoprotective effect in extracts of Enmeiraku was kept to 0.16 mM t-BOOH, whereas it was abolished with the increasing of t-BOOH concentration in extracts of Aboukyu. NAC restore this oxidative injury in the cell treated with Aboukyu extracts. Therefor it suggested that flavonoids ingredients of Aboukyu such as apigenin may act as pro-oxidants and impaired cell viability. Keap1-Nrf2 pathway was activated in the cell treated with extracts of Aboukyu and Enmeiraku. Comparison of Nrf2 and HO-1 level by cultivars will be report.

chrysanthemum, flavonoid, neuroprotective activity

講演番号：2A06a06
講演日時：3 月 18 日 10:45～ A 校舎 06 会場

# 大豆由来の新規グレリン分泌促進ペプチド soy-ghretropin のキャラクタリゼーション

# Characterization of soy-ghretropin, a novel ghrelin-releasing peptide derived from soy protein

○中戸 絢也[1]、青木 隼人[1]、岩倉 浩[2]、金本 龍平[1]、大日向 耕作[1] ([1]京大院・農・食品生物、[2]京大メディカルイノベーションセンター)
○ Junya NAKATO[1], Hayato AOKI[1], Hiroshi IWAKURA[2], Ryuhei KANAMOTO[1], Kousaku OHINATA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Univ. Medical Innovation Center)

【目的】グレリンは、摂食促進作用と成長ホルモン分泌促進作用を有する消化管ホルモンである。このグレリンの分泌を促進する外因性物質については不明な点が多い。一方我々は、マウス胃由来グレリン分泌細胞株を用いた検討により、主要な大豆タンパク質 β-コングリシニン (β-CG)のトリプシン消化により生成する 11 残基のグレリン分泌促進ペプチドを発見し、「soy-ghretropin」と命名した[1]。そこで本研究では、soy-ghretropin の構造―活性相関ならびにグレリン分泌促進機構を検討した。また、soy-ghretropin および β-CG トリプシン消化物の *in vivo* でのグレリン分泌活性を検討した。
【方法】Soy-ghretropin (Asn-Lys-Asn-Pro-Phe-Leu-Phe-Gly-Ser-Asn-Arg)のフラグメントペプチドおよびアラニン置換ペプチドを合成した。これらをグレリン分泌細胞株 MGN3-1[2]に添加し、培養液中の活性型グレリンを ELISA により定量した。また、soy-ghretropin 添加によるグレリン関連遺伝子の mRNA 発現量の変化を検討した。さらに、雄性 ddY マウスに soy-ghretropin および β-CG トリプシン消化物を経口投与し、血中グレリン濃度および摂食量を測定した。
【結果および考察】Soy-ghretropin の N 末端および C 末端のアミノ酸残基を欠失させると、グレリン分泌活性が消失したことから、両末端が活性の発揮に重要であることが判明した。また、N 末端の Asn 残基は Ala への置換が許容された一方で、C 末端の Arg 残基は置換が許容されなかった。さらに、$Phe^5$ および $Ser^9$ を Ala に置換するとグレリン分泌活性が低下したことから、これらが活性発揮において重要であることが判明した。グレリンの前駆体である preproghrelin 遺伝子と、その成熟に関連する ghrelin-*O*-acyltransferase および prohormone convertase 1/3 遺伝子の mRNA 発現量は、soy-ghretropin の添加によりいずれも変化しなかった。本結果は、soy-ghretropin が MGN3-1 細胞内のグレリン量を減少させる実験結果と一致している。したがって、soy-ghretropin はグレリン合成経路ではなく分泌経路に作用すると考えられる。また、マウスに soy-ghretropin および β-CG トリプシン消化物を経口投与したところ、血中グレリン濃度が上昇し、摂食量も増加したことから、これらが *in vivo* でもグレリン分泌促進作用ならびに摂食促進作用を示すことが明らかとなった。
本研究は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業を活用して実施した。

[1] Nakato J *et al. FEBS Lett.* 2016;590(16):2681-9.
[2] Iwakura H *et al. Endocrinology.* 2010;151(6):2940-5.

ghrelin, structure-activity relationship, food protein

発表責任者：大日向耕作（ohinata@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A06a07
講演日時：3 月 18 日 11:00～ A 校舎 06 会場

# ダイゼインは胃内容排出を遅延させ、飼料摂取量を減少させた

# Daidzein decreased food intake and delayed gastric emptying in ovariectomized rats

○阿部 恭大、小林 拓広、藤谷 美菜、岸田 太郎（愛媛大院農）
○Yasuhiro ABE, Takuhiro KOBAYASHI, Mina FUJITANI, Taro KISHIDA (Ehime Univ.)

【背景と目的】大豆イソフラボン、ダイゼインは雌特異的に食欲抑制作用を示す。ダイゼインは腸内細菌によりエコールに代謝される。エコールの摂取はダイゼインの摂取と同様に雌特異的に食欲を抑制し、ダイゼイン摂取ラットの飼料摂取量と血中エコール濃度が負の相関をとったことより、作用物質はエコールであることが示された。ダイゼイン摂取ラットでは、視床下部の urocortin のmRNA は増加傾向を示し、urocortin mRNA と飼料摂取量には負の相関が、urocortin mRNA と血中エコール濃度には正の相関が見られた。先行研究により、urocortin の中枢投与は飼料摂取量の減少と胃内容排出の遅延を引き起こすことが報告されている。2 週間ダイゼインを摂取させたラットではダイゼイン無摂取ラットと比較して、飼料摂取量が減少し解剖時胃重量が増加したことから、胃内容排出が遅延していたと推測された。これらのことから、ダイゼインの摂取は視床下部の urocortin を介して胃内容排出を遅延させ、食欲抑制を引き起こすと仮説を立て、本研究では、ダイゼインの摂取は胃内容排出を遅延させ、食欲を抑制するのかを調べた。このため、短時間の制限給餌に十分慣れさせたラットを用いた。また、性周期の影響を受けず、過食になるため、ダイゼインの食欲抑制効果を顕著に確認できる卵巣摘出（OVX）ラットを用いた。【方法】6 週齢の SD 系雌ラットを搬入し、翌日 OVX を行った。3 日間回復させた後、飼料の摂取を暗期の 3、4 または 6 時間のみ可能とした制限食に 8 日間馴化させた。給餌時間中、飼料は自由摂取させた。その後、各制限食のラットをコントロール (C) 群 (n=8)、ダイゼイン（300 mg/kg 飼料）混餌投与（D）群（n=8）に群分けし 10 日間飼育した。胃内容排出を測定するため、解剖日は全群で 1 時間のみ飼料を自由摂取させ、2 時間絶食後、屠殺して胃の内容物を採取し、胃内容排出を以下の式で算出した。胃内容排出（%）＝（1 時間の飼料摂取量（ｇ）-乾燥胃内容物重量（ｇ））/1 時間の飼料摂取量（ｇ）×100【結果と考察】4 時間制限食群において、C 群と比較して D 群で、ダイゼインの摂取開始 5 日後から解剖前日まで飼料摂取量が有意に減少し、解剖直前の胃内容排出が遅延傾向を示した。6 時間の制限食群でも、C 群と比較して D 群でダイゼインの摂取開始 3 日後から 7 日後まで飼料摂取量が有意に減少し、解剖直前の胃内容排出も遅延傾向を示した。3 時間制限食群においては飼料摂取量および胃内容排出に両群間で差はなかった。いずれの制限食群においても、絶食再給餌後 1 時間の飼料摂取量では C 群と D 群の間に差がなく、ダイゼインの摂取は、空腹時の飼料摂取には影響しないと考えられた。これらの結果から、ダイゼインによる雌特異的食欲抑制に胃内容排出の遅延が関与していることが示唆された。

Daidzein, appetite, gastric emptying

発表責任者：岸田太郎（kishida@agr.ehime-u.ac.jp）

講演番号：2A06a08
講演日時：3 月 18 日 11:15～ A 校舎 06 会場

小腸刷子細胞に発現する遺伝子の生体内機能の検証
Analysis of *in vivo* function of gene X expressed in intestinal brush cells.
○谷下 道大[1]、成川 真隆[1]、石渡 賢治[2]、吉岡 美紗子[1]、朝倉 富子[1]、嘉糠 洋陸[2]、阿部 啓子[1]、石丸 喜朗[1] ([1]東大院農生科、[2]慈恵医大・熱帯医学)
○Michihiro TANISHITA[1], Masataka NARUKAWA[1], Kenji ISHIWATA[2], Misako YOSHIOKA[1], Tomiko ASAKURA[1], Hirotaka KANUKA[2], Keiko ABE[1], Yoshiro ISHIMARU[1] ([1]The Univ of Tokyo, [2]The Jikei Univ)

【背景】小腸上皮細胞の約 0.4%を占める刷子細胞は、60 年以上前からその存在が知られていたが、分化制御機構と細胞機能は長い間不明であった。我々は、転写調節因子 Skn-1a が、味蕾の甘・苦・うま味細胞だけでなく、小腸刷子細胞への運命決定にも必須であることを明らかにした（Ushiama *et al.*, *EBioMedicine*, 2016）。また、*Skn-1* 欠損マウスでは摂餌量は不変だったが、カテコールアミンの過分泌によって消費エネルギーが増加したために、低体脂肪率を伴う顕著な低体重を示した。以上より、刷子細胞や味細胞を起点とし、脳を介して末梢組織（肝臓・筋肉・脂肪組織など）のエネルギー代謝を制御するという新しい概念を提唱した。一方最近、複数のグループから、刷子細胞が寄生虫に対する 2 型免疫応答に関与することも報告された。昨年度の本学会で報告した通り、我々は刷子細胞の機能を規定する分子基盤の解明を目的とし、RNA-Seq 法を用いて野生型と *Skn-1* 欠損マウス小腸における遺伝子発現プロファイルを比較解析した結果、刷子細胞に発現する候補遺伝子群を同定した。
【方法と結果】上述した候補遺伝子のうち、タンパク質 X に対するペプチド抗体を作製して、小腸切片を用いた免疫染色を行った結果、タンパク質 X は刷子細胞の頂端部に局在することが示された。次に、TALEN 法を用いて遺伝子 *X* にフレームシフト変異が導入されたマウスを作出した。免疫染色の結果、*X* 変異マウスでは刷子細胞は存在するが、タンパク質 X は存在しないことが示された。離乳後成長期における体重変化を継時的に測定した結果、*X* 変異マウスは *Skn-1* 欠損マウスと同様に、同腹仔の野生型マウスと比較して低体重を示した。一方、線虫 *Nippostrongylus brasiliensis*（*Nb*）感染実験では、一定数の *Nb* を頸背部に注射し、9 日後に腸内に残存する匹数を計測した。その結果、*Skn-1* 欠損マウスでは既報の通り多数の *Nb* が残存していたが、*X* 変異マウスでは野生型マウスと同数程度の *Nb* しか検出されなかった。さらに、*X* 変異マウスでは、線虫感染に伴う刷子細胞数の増加も野生型マウスと同様に観察されたため、遺伝子 *X* は刷子細胞を介した 2 型免疫応答には関与しないことが示唆された。以上より、X 変異マウスは免疫系以外の原因によって低体重を示す可能性が示唆された。

【謝辞】本研究は、総合科学技術・イノベーション会議の SIP(戦略的イノベーション創造プログラム)「次世代農林水産業創造技術」によって実施されました。

brush cell, metabolism, immunity

講演番号：2A06a09
講演日時：3 月 18 日 11:30～ A 校舎 06 会場

腸内細菌脂肪酸代謝物の代謝改善作用
Metabolic beneficial effects by gut microbial metabolites of dietary fat

○宮本 潤基[1]、粕渕 真由[1]、中島 啓[1]、米島 靖記[2]、岸野 重信[3]、入江 潤一郎[4]、菅原 達也[3]、有田 誠[5]、小川 順[3]、伊藤 裕[4]、木村 郁夫[1]([1]東京農工大学 農、[2]日東薬品工業（株）、[3]京都大学 農、[4]慶應義塾大学 医、[5]理研 IMS)
○ Junki Miyamoto[1], Mayu Kasubuchi[1], Akira Nakajima[1], Yasunori Yonejima[2], Shigenobu Kishino[3], Jun-ichiro Irie[4], Tatsuya Sugawara[3], Makoto Arita[5], Jun Ogawa[3], Hiroshi Itoh[4], Ikuo Kimura[1] ([1]Tokyo Univ. of Agriculture and Technology, [2]Nitto Pharmaceutical Industries, [3]Kyoto Univ., [4]Keio Univ., [5]RIKEN-IMS)

**【背景・目的】**

食事脂質中に多量に含まれるリノール酸（ω-6 脂肪酸）は、我々が生命を維持するために重要な必須脂肪酸であるが、その摂取量が過剰になると炎症やアレルギー反応を惹起することも知られている。リノール酸や不飽和脂肪酸の α-リノレン酸 (ω-3)、そして魚油の EPA (ω-3)や DHA (ω-3)による作用は重要であり、このような ω 脂肪酸は、細胞膜上の脂肪酸受容体である GPR40 や GPR120 に認識されることで、単なるエネルギー源としてだけではなく、生体におけるシグナル伝達分子としてエネルギー代謝制御に重要な役割を果たすことが明らかにされている [1)]。また、腸内細菌学の発展に伴い、食事と腸内細菌叢変化が、宿主のエネルギー恒常性維持に深く関与する結果、肥満や糖尿病などの病態に影響を及ぼすことが明らかになった。さらに、腸内細菌が生化学的な水酸化反応を介して，食事由来の不飽和脂肪酸から新規な水酸化脂肪酸が見いだされ [2)]、我々はこの水酸化脂肪酸が腸管バリア保護作用に寄与することを明らかにした [3)]。この過程で、新規水酸化脂肪酸の一つである HYA (10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid)が前駆体であるリノール酸よりも長鎖脂肪酸受容体に対して高親和性を示すことを確認した。我々は、次なる検討として、食事脂質とその腸内細菌代謝産物群による長鎖脂肪酸受容体を介したエネルギー代謝調節機構の解明を明らかにすることを目的として検討を行った。

**【方法】**

食事脂質あるいは、その腸内細菌代謝産物群を C57BL/6J マウスに投与することで、各種代謝パラメータへの影響を解析した。

**【結果・考察】**

腸内細菌代謝産物群のうち、HYA を投与したマウスでは腸管ホルモン分泌を介した代謝改善作用が確認された。一方、HYA の前駆体であるリノール酸には改善作用が認められなかったことから、腸内細菌が食事脂質中のリノール酸を HYA に変換することで、全身のエネルギー代謝制御に寄与していることが示唆された。今後、より詳細に、HYA を始めとする新たな機能性脂肪酸代謝物の代謝機能への影響評価を行うことにより、既存の食用油に代わる機能性油の創出、さらには脂肪酸代謝物の創薬応用も視野に入れた肥満・糖尿病予防への脂肪酸代謝物応用を目指す。

1) Ichimura *et al.*, 2012. *Nature.* 2) Kishino *et al.*, 2013. *PNAS.* 3) Miyamoto *et al.*, 2015. *J Biol Chem.*

GPCRs, gut microbial metabolite, energy regulation

発表責任者：木村郁夫（ikimura@cc.tuat.ac.jp）

講演番号：2A06a10
講演日時：3 月 18 日 11:45～ A 校舎 06 会場

Impact of chronic high fat and/or high sucrose feeding on meal-induced GLP-1 secretion
○Jukkrapong PINYO, Tohru HIRA, Hiroshi HARA (Hokkaido Univ.)

Nowadays, obesity is one of the major health concerns. It positively correlates with excessive energy intake especially high fat and high sucrose consumption. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) is a gut-derived hormone which is secreted by enteroendocrine L-cells in response to nutrient ingestion. GLP-1 is well recognized as incretin hormone that normalize postprandial glucose homeostasis through stimulating insulin secretion. To date, changes in postprandial GLP-1 response during the progression of diet-induced obesity are not well characterized. The aims of this study were to examine GLP-1 response to meal ingestion during the progression of diet-induced obesity and to determine whether high fat or high sucrose diet largely attribute to obesity (adiposity) development and/or glucose intolerance. Male Sprague-Dawley (SD) rats were fed control diet, high fat diet (HiFat, 30%), or high sucrose diet (HiSuc, 40%) or high fat/high sucrose diet (HFS) totally for 5 weeks. Meal tolerance tests (MTTs) were conducted 2 and 4 weeks after feeding test diet to examine glucose, insulin, and GLP-1 responses after standard (control) diet ingestion. After 5 weeks of feeding period, blood samples from portal vein were taken under sodium pentobarbital anesthesia. The rats were then sacrificed and tissue samples were collected. Body weight gain of Hifat group and adipose tissue weight of HFS group were increased from control group, suggesting HiFat diet had relatively high impact on obesity development. In both of MTTs, glycemia was slightly higher in HFS group, but insulin and HOMA-IR (index of insulin resistance) were significantly higher in HFS group among treatments. GLP-1 responses were higher in HFS and HiFat group after 2 weeks, but after 4 weeks HiSuc group also had higher response, compared to control group. These findings suggest Hifat diet had greater impact on obesity (adiposity) development and insulin resistance rather than HiSuc diet, and continuous ingestion of excessive fat rapidly enhances sensitivity of GLP-1-producing cells to luminal nutrients.

Diet-induced obesity, Glucagon-like peptide-1, Meal tolerance tests

発表責任者：Tohru HIRA（hira@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：2A06p01
講演日時：3 月 18 日 14:00～ A 校舎 06 会場

粉末あるいは固形飼料を長期間摂取させたラットの血圧調節と視床下部遺伝子発現変動
Blood pressure regulation by long-term feeeding of powdery diet or chow diet to rats and their gene expression difference at the hypothalamus

○齊藤 美佳[1]、永井 俊匡[1]、小川 真奈[2]、石丸 喜朗[2]、阿部 啓子[2,3]、朝倉 富子[2] ([1]高崎健大・栄養、[2]東大院農生科・応生化、[3]神奈川科学技術アカデミー)
○Mika SAITO[1], Toshitada NAGAI[1], Mana OGAWA[2], Yoshiro ISIMARU[2], Keiko ABE[2,3], Tomiko ASAKURA[2] ([1]Takasaki Univ of Health and Welfare, [2]Univ Tokyo, [3]KAST)

【背景・目的】咀嚼は、脳の活性化、運動機能・免疫機能向上、骨粗鬆化抑制、肥満の抑制などの生理作用を持ち、単なる消化作用だけではなく、生命の維持に重要で広範な作用を持つ。しかし、咀嚼に関するこれまでの研究は、行動学および生化学的な研究が多く、遺伝子レベルの研究は進んでおらず、報告も少ない。そこで本研究は、粉末および固形飼料による咀嚼方法の違いが、ラットの身体、特に脳にどのような影響を及ぼすのかを明らかにすることを目的とし、DNA マクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析を行った。

【方法・結果】3 週齢の Wistar 系雄ラットに粉末または固形飼料を与え(各群 n= 5)、15 週間飼育した。飼育期間中の体重や摂食量、解剖時の全採血試料を用いた血液生化学的解析では両群で有意差は見られず、咀嚼刺激以外に栄養学的要素の差はないことが示された。最終週に血圧測定を行い、固形飼料群で血圧が有意に低下することが明らかとなった。そこで両群における視床下部の遺伝子発現に着目して、解剖で得た視床下部から total RNA を抽出し、Affymetrix Rat Genome 230 2.0 array を用いた DNA マイクロアレイ解析を行った。

統計ソフト R を用いて qFARMS 法で正規化し、Rank Products 法による 2 群間比較を行ったところ、False Discovery Rate (FDR) < 0.05 を有意に発現変動した遺伝子として、278 プローブセットを抽出した。ウェブツール DAVID を用いて、Benjamini and Hochberg の FDR で多重比較補正した EASE Score < 0.05 となる Gene Ontology (GO) Term を抽出し、Quick GO でそれらを階層化した。抽出された 8 個の最下層 GO Term は、神経伝達、ホルモン代謝、その他の 3 つの機能的グループに分類された。これらの GO Term には、血圧調節に関連する遺伝子が複数含まれており、それらが視床下部-下垂体-副腎系や交感神経活動、バソプレシンを介した血圧調節に関与していることが推察された。以上の結果から、固形飼料によって咀嚼頻度が多くなると、視床下部の遺伝子発現変動を介して、血圧が有意に低下することが示唆された。

【謝辞】本研究は、総合科学技術・イノベーション会議の SIP(戦略的イノベーション創造プログラム)「次世代農林水産業創造技術」によって実施されました。

Mastication, Hypothalamus, Blood pressure

発表責任者：朝倉　富子（asakura@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A06p02
講演日時：3 月 18 日 14:15～ A 校舎 06 会場

# 粉末あるいは固形飼料を長期間摂取させたラットの視床における発現遺伝子の比較解析

# Comparative analysis of gene expression in the thalamus of rats with long-term feeding of powdery diet or chow diet

○小川 真奈[1]、永井 俊匡[2]、齊藤 美佳[2]、石丸 喜朗[1]、阿部 啓子[1,3]、朝倉 富子[1]([1]東大院農生科・応生化、[2]高崎健大・栄養、[3]神奈川科学技術アカデミー)
○Mana OGAWA[1], Toshitada NAGAI[2], Mika SAITO[2], Yoshiro ISIMARU[1], Keiko ABE[1,3], Tomiko ASAKURA[1] ([1]Univ Tokyo, [2]Takasaki Univ of Health and Welfare, [3]KAST)

【背景・目的】齧歯類の離乳期直後の成長期における軟食摂取は、咀嚼機能の低下を引き起こすことが知られている。先行研究において、咀嚼が脳機能に与える影響を調べるために、咀嚼頻度の異なる固形飼料あるいは粉末飼料をラットに与えて 15 週間の飼育を行い、視床下部の DNA マイクロアレイ解析を行った。本研究では、大脳皮質咀嚼野と相互連絡する視床に着目し、咀嚼頻度の異なる飼料を摂取した際の視床における発現遺伝子の違いを、DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析することで、咀嚼が視床に与える効果の一端を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】視床・視床下部・海馬・小脳から total RNA を抽出し、Gene Chip Rat Genome 230 2.0 Array を用いて DNA マイクロアレイ解析を行った。統計ソフト R を用いて qFARMS 法により正規化をし、クラスタリングを行ったところ、4 部位のうち視床でのみ粉末飼料群と固形飼料群が異なるクラスターを形成した。Rank products 法を用いて 2 群間比較を行い、2322 個の False Discovery Rate (FDR) < 0.05 のプローブセットが有意に発現変動した遺伝子(DEG) として抽出された。ウェブツール DAVID を用いて、Benjamini and Hochberg の FDR で多重比較補正した EASE Score < 0.05 の Gene Ontology (GO) Term を抽出し、Quick GO でそれらを階層化した。抽出された 16 個の GO term は 3 つのグループに分けられ、咀嚼によって視床で有意に発現変動した遺伝子は、タンパク質合成、神経伝達、神経形態形成の機能を有することが示された。また、Ingenuity Pathway Analysis (IPA)を用いた DEG の機能解析からも、タンパク質合成、神経伝達、神経形態形成、免疫に関わる canonical pathway が抽出された。以上のことから、離乳直後の成長期に咀嚼頻度の高い固形餌を摂取し、より強度の感覚刺激が入力されることで、視床の神経ネットワーク形成が変化する可能性が示唆された。
　次に上記のような発現遺伝子変動が、短期間でも生じるかどうかを調べるために、離乳直後の 3 週齢のラットに咀嚼頻度の異なる餌を 8 日間与えた後、視床のマイクロアレイ解析に供したところ、長期飼育同様、2 群間で遺伝子発現プロファイルが異なることが明らかとなった。IPA を用いた DEG の機能解析からは、タンパク質合成や神経形態形成に関る canonical pathway が抽出された。このことから、長期間の場合と同様に、短期間の咀嚼でも、タンパク質合成や神経形態形成に寄与し、視床の神経ネットワーク形成が変化する可能性が示唆された。
【謝辞】本研究は、総合科学技術・イノベーション会議の SIP(戦略的イノベーション創造プログラム)「次世代農林水産業創造技術」によって実施されました。

Mastication, Thalamus, DNA microarray

発表責任者：朝倉　富子（asakura@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A06p03
講演日時：3 月 18 日 14:30～ A 校舎 06 会場

# AgRP 神経回路の活動が味覚感受性に与える影響の解析

# AgRP neuron circuits modulate taste sensitivities in mice

○傅 欧、岩井 優、三坂 巧、中島 健一朗（東大院農生科・応生科）
○Ou Fu, Yu Iwai, Takumi Miasma, Kenichiro Nakajima (The University of Tokyo.)

【背景・目的】味覚は、食物の価値判断基準として機能している。例えば、甘味は栄養価が高い糖質が呈する味であるため、多く摂取される。一方で、苦味は毒物や腐敗物が呈する味であるため、基本的には忌避される。生物における味の感じ方は、空腹や満腹など生理状態によって変化することが知られているものの、どのような機構でその感受性が変化するかについては、依然として不明である。

視床下部弓状核に局在するアグーチ関連ペプチド産生神経（以下 AgRP 神経と表記）は、絶食時に脳内で最初に興奮し、脳内の様々な部位に投射することで、摂食亢進に必要な神経ネットワークの活動を引き起こす。このため、空腹に伴う味覚感受性の変化においても、AgRP 神経の神経活動が大きく寄与している可能性が考えられた。

本研究では、光遺伝学を用いて AgRP 神経を部位特異的に活性化することで、いわば人工的に空腹状態を再現し、AgRP 神経に複数存在する投射先のうち、どの部位が最も味嗜好性に影響を及ぼすかについて明らかにすることを目的とした。

【実験方法】光応答性イオンチャネルであるチャネルロドプシン 2 を Cre リコンビナーゼ依存的に発現するようなアデノ随伴ウイルスを構築し、AgRP 神経特異的に Cre リコンビナーゼを発現する遺伝子改変マウスの視床下部に導入した。ウイルス感染マウスにおいては、脳深部に挿入した光ファイバーにより青色光を照射することで、AgRP 神経が選択的に興奮し、摂食行動が誘引される。AgRP 神経の投射先に光ファイバーをそれぞれ限局的に挿入し、各投射経路を選択的に活性化した場合に、味覚感受性がどのように影響を受けるかについて、Brief Access Taste Test によって評価した。

【結果・考察】AgRP 神経の細胞体が局在する視床下部弓状核を光刺激すると、甘味溶液に対する感度が上昇することが明らかになった。一方、苦味や酸味など忌避される味に対する感度は、AgRP 神経の活動に応じて低下した。また、AgRP 神経の各投射先を限定的に光刺激したところ、多くの部位における光刺激で摂食亢進が見られたのに対し、味に対する感受性変化が生じる部位と生じない部位があることが明らかになった。以上の結果から、AgRP 神経の投射先のうち、一部経路のみが選択的に味覚感受性に影響を与えることが示唆された。

本研究は、総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」、およびロッテ重光学術賞の助成により実施された。

AgRP neuron circuits, taste sensitivities, optogenetics

講演番号：2A06p04
講演日時：3 月 18 日 14:45～ A 校舎 06 会場

# 橋結合腕傍核の味覚応答部位からの神経の投射パターンの解析

# Neural Projections from Taste-responsive Region of the Pontine Brachial Nucleus

○岩井 優、傅 欧、三坂 巧、中島 健一朗（東大院農生科・応生化）
○Yu IWAI, Ou HU, Takumi MISAKA, Kenichiro NAKAJIMA (University of Tokyo)

[背景・目的]

味覚は甘・旨・酸・塩・苦の 5 つの基本味から構成され、食物の価値の判断基準として機能する。味は舌→延髄→後脳→視床という複数の中継点を介して伝達され、最終的に大脳皮質味覚野で認識される。本研究では後脳における味覚伝導路である橋結合腕傍核(PBN)に注目し、PBN 内で特に味覚に応答する神経が局在する部位に存在する神経について、投射パターンを詳細に解析した。

[方法]

PBN 内での味覚応答神経が局在する部位において転写因子 SatB2 が発現していることに注目し、SatB2 発現神経特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウスを作出した。このマウスの PBN に、Cre 依存的にシナプトフィジン(神経末端に局在する性質をもつ)と mCherry の融合タンパク質を発現する組換えアデノ随伴ウイルスを導入することで、SatB2 発現神経の神経末端を標識した。ウイルス導入後 2-3 週間後、脳を潅流固定し、mCherry の発現パターンを蛍光免疫染色により解析した。

[結果・考察]

PBN の SatB2 発現神経に外来的に発現させたシナプトフィジン-mCherry 融合タンパク質の局在を観察した結果、Satb2 発現神経が視床に強く投射していることが判明した。この投射が示す神経回路は、前述の後脳と視床をつなぐ味覚伝導路であると考えられる。一方、興味深いことに、一部の SatB2 発現神経は情動に関連する扁桃体や分界条床核に投射していただけではなく、摂食に関連する外側視床下部への投射している様子も観察された。これらのことから、PBN の SatB2 発現神経は味の認知に関与するだけではなく、味を感じた時に生じる好き嫌いなどの感覚や、食欲の制御にも関与している可能性が示唆された。今後、SatB2 発現神経の活動が、味刺激を受容した際のマウスの行動に与える影響を明らかにしたい。

本研究は，総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」およびロッテ重光学術賞の助成により実施された。

taste, brain, mouse

講演番号：2A06p05
講演日時：3 月 18 日 15:00～ A 校舎 06 会場

# 食刺激が離乳期のマウス大脳皮質における遺伝子発現へ及ぼす影響

# Influence of food stimulation on gene expression profile throughout the weaning period in the mouse cerebral cortex

○河江 真宏、三坂 巧、成川 真隆（東大院農生科・応生化）
○Masahiro KAWAE, Takumi MISAKA, Masataka NARUKAWA (Dept.Appl.Biol.Chem., The Univ.Tokyo)

【背景と目的】子供の頃に何を食べていたのかが、大人になってからの嗜好性に影響を及ぼすことも示唆されている。特に離乳期は、母乳から母乳以外の食事へと移行し、食環境が大きく変化する時期である。したがって、この時期に経験する新規食刺激は、将来の嗜好性に大きな影響を与えることが予想される。基本味に関する味覚情報や食感などの体性感覚情報は、口腔内で受容された後、大脳皮質味覚野・体性感覚野で処理され、それぞれ味・食感として認識される。このような刺激が、これらの部位で具体的にどのような変化を起こすのかについて、詳細は不明である。本研究では、離乳期に初めて固形食を摂取した経験が脳に及ぼす影響について、食刺激依存的な遺伝子発現変動から明らかにすることを目的とした。我々はこれまでに DNA マイクロアレイ解析により、離乳期前後にマウスの味覚野・体性感覚野で大きく発現変動する遺伝子の探索を行ってきた。今回はそれらの分子について定量的な発現解析を行い、固形食刺激により発現量が増加する遺伝子の絞り込みを行った。
【方法】母乳と固形食の両方を摂取しうる環境下で C57BL/6J の哺育マウスを飼育し、離乳期の前後の異なる 4 つの時期に、仔マウスより味覚野・体性感覚野を摘出した。このサンプルから RNA を抽出して cDNA を作製し、リアルタイム PCR に供することで、各遺伝子の経時的な発現変動を解析した。さらに、離乳期前後を比較して発現量が増加した分子群については、それが食刺激依存的なのか、あるいは日齢依存的なのかを判別するため、固形食を与えずに母乳のみで飼育した同日齢のマウスを準備し、同様の手法で各遺伝子の発現量を調べた。
【結果】固形食を摂取可能な環境下で飼育した 4 群の仔マウスを対象に解析したところ、21 の遺伝子について、離乳期の前後で発現量が有意に増加していることが、リアルタイム PCR の結果から判明した。いずれの分子も 23 日齢時には発現量が離乳前よりも増加している傾向が観察されたため、母乳のみで飼育した仔マウス群を 23 日齢でサンプリングし、前述の 21 の遺伝子について、リアルタイム PCR による解析を行った。その結果、固形食摂取の有無により発現量に有意な差が認められた遺伝子が半数近く存在していたため、これらを「離乳期の固形食摂取により発現変動が生じた分子」の候補として設定した。現在、更なる条件付けを行って候補分子の絞り込みを進め、発現分子の局在解析を行うための準備を行っている。
本研究の一部は総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施された。

taste, gene expression, weaning period

講演番号：2A06p06
講演日時：3 月 18 日 15:25～ A 校舎 06 会場

メチオナールの旨味受容体活性化メカニズムの解明
Molecular Mechanism Underlying the Activation of the Umami Taste Receptor Induced by Methional

○戸田 安香[1,2]、中北 智哉[3]、成川 真隆[1]、山下 有紀[2]、中島 文子[2]、三坂 巧[1]（[1]東大院農生科・応生化、[2]キッコーマン（株）、[3]京大院・医）
○Yasuka Toda[1,2], Tomoya Nakagita[3], Masataka Narukawa[1], Yuki Yamashita[2], Ayako Nakajima[2], Takumi Misaka[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo, [2]Kikkoman Corp., [3]Grad. Sch. Med., Kyoto Univ.)

【背景】メチオナールは、メチオニンのストレッカー分解により生じる肉様の香気成分であり、調味料や食肉加工品など様々な加工食品の風味増強に産業利用されてきた。これまでに、メチオナールの香りに旨味を想起させる効果があることが報告されているが、末梢の旨味受容に与える影響については明らかになっていない。そこで本研究では、末梢で旨味受容を担う G タンパク質共役型受容体のヘテロダイマー（T1R1/T1R3）におけるメチオナール活性の評価を行うこととした。

【方法】T1R1/T1R3 の活性化能の評価には、これまでに我々が構築してきた培養細胞による高感度評価系を用いた（2014 年度大会にて報告）。HEK293T 細胞に、旨味受容体（T1R1 および T1R3）、キメラ G タンパク質、発光タンパク質を一過的に発現させ、味物質添加時の発光値の変化をマルチウェルプレートリーダーにて検出することで、旨味受容体の活性化の強さを評価した。

【結果と考察】メチオナール添加時に、ヒト旨味受容体のアミノ酸に対する応答が有意に増強された。このことより、香気成分として知られるメチオナールが、末梢の味覚受容体にも作用することが明らかとなった。またメチオナールは、既知の旨味受容体活性化剤であるイノシン酸とは競合することなく、旨味受容体のアミノ酸応答を増強したことから、メチオナールとイノシン酸は異なる部位に作用することが示唆された。作用部位の探索のため、旨味受容体の変異体解析を行ったところ、メチオナールの作用部位が T1R1 サブユニットの膜貫通領域に存在することが明らかになった。一方で、イノシン酸の結合部位は T1R1 の細胞外領域に存在することから、メチオナールとイノシン酸による旨味受容体の活性調節は異なるメカニズムにより引き起こされることが示された。

これまでに天然に由来する旨味受容体活性化物質としてはアミノ酸に加え、イノシン酸やグアニル酸といった核酸しか知られていない。本研究により、新たな旨味受容体活性化物質と作用部位が同定できたことは、旨味受容の分子メカニズムに関する更なる理解に繋がることと期待される。また、メチオナールは食品添加物として利用されるだけでなく、醤油やトマト、チーズなど、世界中の料理に欠かせない食材に主要香気成分として、そもそも含有されている。これらの食品は共通して、ヒトが強い旨味を感じるグルタミン酸も多く含んでいることから、メチオナールが嗅覚と味覚両方の経路から旨味を強めることで、世界の食卓のおいしさに貢献している可能性を示すものと期待している。

Taste, Umami, GPCR

講演番号：2A06p07
講演日時：3 月 18 日 15:40～ A 校舎 06 会場

甘味物質とヒト甘味受容体膜貫通領域の相互作用モデルの検討
Evaluation of the binding models of sweeteners and transmembrane domain of the human sweet taste receptor
○松谷 拓弥[1]、中北 智哉[2]、広川 貴次[3]、三坂 巧[1] ([1]東大院農生科・応生化、[2]京大院・医、[3]産総研)
○ Takumi Matsuya[1], Tomoya Nakagita[2], Takatsugu Hirokawa[3], Takumi Misaka[1] ([1]Dept.Appl.Biol.Chem., The Univ.Tokyo, [2]Grad. Sch. Med., Kyoto Univ., [3]AIST)

**【背景・目的】**

Class C GPCR に属する T1R2 及び T1R3 は、ヘテロダイマーを形成し、甘味受容体として機能することが知られている。これらの結晶構造は未だ解かれていないが、キメラ受容体や点変異体を用いた解析により、各種甘味物質の作用部位が一部同定されている。ショ糖をはじめとする低分子甘味物質の多くは、T1R2 の細胞外ドメインに作用するが、シクラメートなど、いくつかの甘味物質は T1R3 の膜貫通領域（TMD）に作用することが報告されている。ネオヘスペリジンジヒドロカルコン（NHDC）は、T1R3 の TMD に作用する甘味物質の一つである（Winnig *et al.*, 2007）。

近年、T1Rs と同じく class C GPCR に属する、代謝型グルタミン酸受容体 mGluR1 の TMD の不活性型構造が解かれたことで(Wu *et al.*, 2014)、T1R3 の TMD の高精度なホモロジーモデルを構築できるようになった。そこで、このモデルに対し、リガンドとして NHDC をドッキングし分子動力学計算を行うことで、NHDC 結合型モデルの取得に成功している。本研究では、このモデルを参考とし、ヒト T1R3 の TMD と、甘味物質との相互作用様式のより精細な検討を試みている。甘味受容のメカニズムを探ることで、新規甘味物質や甘味調節物質の開発へ貢献することを志向する。

**【手法】**

遺伝子工学的手法により、ヒト甘味受容体 hT1R2 / hT1R3 の点変異体およびキメラ G タンパク質 Gα16gust44 の発現プラスミドを構築し、Flp-In システムを用いてこれらを安定的に発現する培養細胞を作製した。甘味受容体安定発現細胞に蛍光カルシウム指示薬を取り込ませた後リガンドを投与し、リガンド濃度依存的な蛍光強度の増加を計測することで、リガンドに対する応答を、甘味受容体の活性化に伴う細胞内 $Ca^{2+}$濃度上昇を介して検出した。点変異導入による活性の変化を評価し、結果を分子モデルと比較検討して考察した。

**【結果】**

モデル上において、T1R3 TMD のバインディングポケットを構成している残基を対象として、点変異を導入し、NHDC に対する活性を解析することで、バインディングポケットの物理的、化学的特性を精査した。その結果、これまで未同定の新たな相互作用残基を発見し、既報のものと合わせて相互作用様式をより詳細に考察することができた。

sweet taste receptor, site-directed mutagenesis, modeling

講演番号：2A06p08
講演日時：3 月 18 日 15:55～ A 校舎 06 会場

# 食品由来の神経分化調節活性化合物の探索

# Search for bioactive food ingredients affecting neural differentiation

○川村 緑、新井 大祐、伏谷 伸宏、中尾 洋一 (早大理工)
○Midori KAWAMURA, Daisuke ARAI, Nobuhiro FUSETANI, Yoichi NAKAO (Waseda Univ.)

成人の脳にも神経幹細胞が存在し、ニューロンやグリア細胞を生涯にわたり供給し続けることが知られている。また、神経幹細胞とニューロン・グリア新生の異常が、アルツハイマー病などの神経変性疾患、およびうつ病などの精神障害に深く関与することが明らかになりつつあり、神経幹細胞の増殖や分化の調節による新たな治療法開発の可能性が注目を集めている。このような背景から、日常的に摂取可能な食品中の成分に神経幹細胞の分化調節活性を見出すことができれば、予防医学や QOL の向上に貢献できると考えた。このため我々は、マウス ES（Embryonic Stem）細胞由来の神経幹細胞を用い、そこに様々な食品成分を添加した際の分化調節活性を指標として、食品中の有効成分の探索を行っている。

神経分化調節活性の評価には、マウス ES 細胞株 J1 から誘導した神経幹細胞を使用した。回収した神経幹細胞を 96 well プレートに播種して 3 日間未分化維持培地で培養したのち、サンプルを添加した分化培地にてさらに 3 日間培養した。培養後、ニューロンおよびアストロサイトそれぞれの分化マーカーに対する抗体を用いて免疫染色し、それぞれの細胞数をカウントすることで分化誘導率を算出して活性を評価した。

以上の方法を用いて様々な食品抽出物についてスクリーニングを実施したところ、市販の春ウコン抽出物にアストロサイトへの分化を顕著に促進する活性が認められた。そこで春ウコンに含まれる活性本体を単離・構造決定することとした。まず、春ウコン抽出物（乾燥重量 110 g）をメタノールに懸濁し、これをろ過したろ液を濃縮後、水とクロロホルムで二層分配した。ついで有機層を濃縮して各種カラムクロマトグラフィーに付し、得られた各画分について神経分化に対する影響を調べた。この結果、ひとつの画分にアストロサイトへの分化促進活性を認めた。

本画分に含まれる活性本体について、測定した各種スペクトルの解析を行った。

astrocyte, neural stem cell, bioactive compound

講演番号：2A06p09
講演日時：3 月 18 日 16:10～ A 校舎 06 会場

# ピセアタンノールは神経幹細胞からアストロサイトへの分化を促進する

# Piceatannol promotes neural stem cell differentiation into astrocytes

○新井 大祐[1]、片岡 亮佑[1]、大塚 悟史[1]、川村 緑[1]、内田 裕子[2]、齋 政彦[2]、伊藤 建比古[2]、中尾 洋一[1]([1]早大、[2]森永製菓（株））

○Daisuke ARAI[1], Ryousuke KATAOKA[1], Satoshi OTSUKA[1], Midori KAWAMURA[1], Hiroko MARUKI-UCHIDA[2], Masahiko SAI[2], Tatsuhiko ITO[2], Yoichi NAKAO[1] ([1]Waseda Univ., [2]Morinaga & Co.)

アストロサイトは脳に最も多く存在するグリア細胞の一種であり、栄養補給などニューロンを支える重要な役割を担っている。パッションフルーツ種子に多く含まれるピセアタンノールはレスベラトロールの類縁体であり、sirtuin の活性化や血管内皮の機能改善に関わることが知られているが、アストロサイトをはじめとする脳細胞の機能に及ぼす影響については研究の余地が残されている。近年、アストロサイトの減少と鬱やストレスとの関連も指摘されていることから、ピセアタンノールおよびレスベラトロールの抗ストレス作用の評価の一環として、これらのアストロサイト分化への影響を調べることとした。

マウス ES 細胞を既報に従い *in vitro* で神経幹細胞に誘導し、さらにアストロサイトへと選択的に分化させた。このとき、ピセアタンノールあるいはレスベラトロールを様々な濃度で添加した。ピセアタンノールを 2.5 μM の濃度で添加することにより、アストロサイトへの分化率が向上することが判明した。一方、同濃度のレスベラトロールは活性を示さなかった。*In vivo* での機能を検証するために、成体マウス (BALB/c オス 9 週齢) に胃ゾンデを用いて 1 日 1 回、2 週間にわたりピセアタンノールあるいはレスベラトロールを経口投与し、海馬におけるアストロサイト数の変化を調べた。その結果、ピセアタンノールを 10 mg/kg body weight で投与したマウスの海馬でアストロサイト数の増加が認められた。アストロサイトの活性化は細胞障害や炎症との関連が知られているが、ピセアタンノール投与マウスの脳内において炎症が起こっていないことを確認した。*In vitro* と同様、レスベラトロール投与マウスではアストロサイト数の変化は認められなかった。

以上より、ピセアタンノールはレスベラトロールにない特徴的な機能として、神経幹細胞からアストロサイトへの分化を促進することがわかった。また経口投与したマウスの脳でもアストロサイトが増加したことから、ピセアタンノールを食品やサプリメントとして摂取した際にも同様の機能を発揮する可能性が示唆された。

Piceatannol, Astrocytes, Cellular differentiation

発表責任者：新井大祐（arai@aoni.waseda.jp）

講演番号：2A06p10
講演日時：3 月 18 日 16:25～ A 校舎 06 会場

スピラントールによる塩味増強効果の作用機構の解明
Spilanthol modulates salty taste on the chorda tympani nerve response in SD rats.
○吉田 喬亮[1]、宮澤 利男[2]、庄司 靖隆[2]、ブルース ブライアント[3]、後藤 知子[1]、白川 仁[1]、駒井 三千夫[1] ([1]東北大学大学院農学研究科、[2]小川香料株式会社、[3]モネル化学感覚センター)
○Kyosuke YOSHIDA[1], Toshio MIYAZAWA[2], Yasutaka SHOJI[2], Bryant BRUCE[3], Tomoko GOTO[1], Hitoshi SHIRAKAWA[1], Michio KOMAI[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Ogawa & Co., Ltd., [3]Monell Chemical Senses Center)

塩化ナトリウム(NaCl) は、ヒトの生理機能を正常に営むために不可欠な物質である。また、飲食物に塩味を付与して美味しく調味する目的や、食物の保存性の向上や物性改善などを目的として広く一般に用いられている。しかし、その過剰摂取は高血圧、心臓疾患、腎臓疾病などの原因となることから、現代社会においては、食塩の過剰摂取を抑える必要が高まっている。そのため、塩味を効果的に増強させ、結果的に NaCl 添加量を削減することが出来る塩味増強剤の開発が期待されている。スピラントール (Spilanthol) はキク科オランダセンニチ(*Spilanthes acmella*:別名 ハトウガラシ)やキバナオランダセンニチ(*S. acmella var. oleracea*)に含まれる辛味成分である。小川香料とモネル化学感覚研究所では、スピラントールの基本味修飾作用を検討してきた。これまでにヒトの味官能評価試験で塩味増強効果が確認されており、先行研究から電気生理学的な検討においても塩味増強効果が確認された。本研究では、スピラントールによる塩味増強作用機構を解明するために、塩味を中心にラット鼓索神経を用いて証明することを目的とした。

実験動物は SD 系雌ラット(8～10 週齢)として、左側鼓索神経束を結合組織から遊離させ、白金電極に接触させた。不関電極は手術野付近に接触させた。舌に味刺激溶液を流した時に生じるインパルス放電を増幅、積分してペンレコーダーで記録した。用いた味刺激溶液は、スピラントール(2.6 - 89.6 μM)、NaCl(0.1 M)で、標準液には冷水(4℃)を用いた。各刺激液に対する応答は、刺激開始から 120 秒後までの曲線下面積(AUC)を算出し、冷水に対する相対値として算出し、解析を行った。

Whole-Nerve の鼓索神経応答において、低濃度のスピラントール(11.2 μM)を NaCl(0.1 M)に混合することで、持続的な応答 (tonic response) に顕著な増強効果が観察された。さらに、Whole-Nerve の鼓索神経を物理的に割くことで、ENaC 阻害剤である Amiloride の感受性が異なる、N-type Rich Bundle (Amiloride-sensitive) と E-type Rich Bundle (Amiloride-Insensitive) に分割して、応答のメカニズムを解析した。本研究では、この条件下で検討した成果を報告する予定である。

salty taste, chorda tympani, spilanthol

発表責任者：吉田喬亮（k.yoshida@g-mail.tohoku-university.jp）

講演番号：2A06p11
講演日時：3 月 18 日 16:50～ A 校舎 06 会場

マウス味細胞と味神経間の情報伝達機構の解明
Type III Taste Cells have Two Functions：Reception of "ATP" and "Sour tastant"
○藤本 典大、清水 英憲、林 由佳子（京都大学大学院　農学研究科　農学専攻　品質評価学分野）
○Norihiro FUJIMOTO, Hidenori SHIMIZU, Yukako HAYASHI (Laboratory of Quality Analysis and Assessment, Grad. Sch. of Agric. Kyoto Univ.)

【背景と目的】味刺激の受容は 4 種類の味細胞からなる味蕾により行われており、この味細胞のうちⅡ型細胞が甘味・苦味・うま味を、Ⅲ型細胞が酸味を受容すると言われている。味細胞で受容された味情報は味神経へと伝達されていくが、味神経と直接シナプスを形成しているのはⅢ型細胞のみであり、Ⅱ型細胞で受容された味情報が味神経に伝達されている機構はいまだわかっていない。

現在、味刺激を受けたⅡ型細胞が情報伝達物質として ATP をⅢ型細胞に向けて放出し、Ⅲ型細胞が情報伝達物質としてセロトニンを味神経に放出することにより、味情報を伝達するという説が提唱されている。この説に基づくと、Ⅲ型味細胞は「味受容細胞としての酸味を受容する役割」と「Ⅱ型細胞から伝達された味情報を統合する役割」を持つと考えられる。１種類のⅢ型細胞が２つの役割を担っているのか、もしくはⅢ型細胞がさらに機能分化することで２つの役割を２種類のⅢ型細胞が担っているのかを調べた本研究室の先行研究により、Ⅲ型細胞は機能分化して２種類あるということが明らかにされた。　そこで本研究では２種類存在したと明らかになったⅢ型細胞が、現在考えられている味情報伝達機構を共通して利用しているのか、すなわち２種類のⅢ型細胞のどちらもが神経伝達物質としてセロトニンを利用しているのか確認することを目的とした。

【実験手法】免疫組織染色とカルシウムイメージング法を用いた。まず初めに、セロトニンが神経伝達物質として放出されていることを確認するため、有郭乳頭の味蕾でのセロトニン分布を免疫組織染色で調べた。次に、機能面から実証するために、カルシウムイメージング法を用い、味溶液に応答した細胞における受容体とセロトニンの局在性を確認した。

【結果と考察】Ⅲ型細胞マーカーである NCAM とセロトニンの共発現率は比較的高い一方で、酸味受容細胞としての役割を持つⅢ型細胞に特異的に発現している CAR-4 とセロトニンの共発現率は低かった。また、カルシウムイメージングによる機能性からの結果から、２種類のⅢ型細胞のどちらもがセロトニンを有しているわけではない可能性が出てきた。さらに、酸味に応答する細胞はセロトニンを有する一方で、ATP 受容体を有していないという結果が得られた。これより２種のⅢ型細胞の味神経に対する情報伝達機構は共通したものではないこと可能性があることが示唆された。今後は ATP に応答する細胞にセロトニンの局在性を調べ、この可能性の確認を行っていく予定である。

taste, mouse, serotonin

発表責任者：藤本　典大（fujimoto.norihiro.84x@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A06p12
講演日時：3 月 18 日 17:05～ A 校舎 06 会場

# 苦味受容体抗体による苦味感受性の増強

# The enhancement of bitter sensitivity by the antibody against a bitter taste receptor

○壇 淳[1]、金谷 華帆[1]、佐藤 創平[1]、水谷 公彦[1]、三上 文三[1]、前橋 健二[2]、伊井野 貴史[3]、堀江 健二[3]、金 武祚[3]、林 由佳子[1] ([1]京大院・農、[2]東京農大・応生科、[3]株式会社ファーマフーズ)
○Atsushi DAN[1], Kaho KANATANI[1], Sohei SATO[1], Kimihiko MIZUTANI[1], Bunzo MIKAMI[1], Kenji MAEHASHI[2], Takashi IINO[3], Kenji HORIE[3], Mujo KIM[3], Yukako HAYASHI[1] ([1]Grad. Sch. Agr., Kyoto Univ., [2]Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. Agri., [3]Pharma Foods International Co., Ltd.)

【背景と目的】　苦味は G タンパク質共役型受容体(GPCR)の一種である苦味受容体(T2R)により受容され、ヒトにおいては、ヒト苦味受容体(hT2R)によって受容される。hT2R は 25 種類存在し、口腔内だけではなく体内の様々な部位に発現し、ヒトの生理機能調節に関わることが報告されている。そのため苦味受容体の活性に影響を与える物質を作成し、苦味受容体を活性化することができれば、新規機能性食品や医薬品開発に応用できると考えられる。また、苦味受容体の活性化を抑制することができれば、苦味を抑えた医薬品や食品の開発につながると考えられる。

そこで我々は、hT2R の一種である hT2R16 とそれに対する鶏卵抗体に着目し、鶏卵抗体が hT2R16 の活性に及ぼす影響を調べた。鶏卵抗体は、哺乳類が血液中に産生する抗体とは異なり、卵黄中に移行・蓄積し、食用が可能である。そのため、食品や医薬品へ応用しやすいことから着目した。

【方法】初めに酵母発現系により、hT2R16 の大量精製を行った。SDS-PAGE とウェスタンブロッティングにおいて同一の場所にシングルバンドが得られたことと、ゲルろ過クロマトグラフィーにより単一のピークが見られたことから高純度に精製できていることを確認した。加えて、CD スペクトル測定により hT2R16 が二次構造を保持していることも確認した。次に、精製した hT2R16 に対する鶏卵抗体を作成した。鶏に抗原となる hT2R16 を注射後、適宜追加免疫を行った。ELISA 法により卵黄の抗体力価が上昇したことを確認後、力価が安定した卵黄よりカラギーナン法によって抗体を精製した。SRID 法による測定で精製抗体中の抗 hT2R16 抗体の純度は約 97%であることを確認した。この抗 hT2R16 抗体が hT2R16 に結合するかどうかを確認するために、hT2R16 発現 HEK293F 細胞に対して抗 hT2R16 抗体による免疫細胞染色を行った。

【結果と考察】抗原抗体反応による蛍光が観察された。また、ELISA により抗 hT2R16 抗体の力価測定を行った結果、コントロール抗体に比べ力価が上昇し、抗 hT2R16 抗体が hT2R16 に結合することが分かった。最後に抗 hT2R16 抗体の特性を、ヒトを用いた官能評価により行った。VAS により、抗 hT2R16 抗体は苦味を誘発しないことが明らかとなった。しかし、抗体を摂取した後に hT2R16 のリガンドであるサリシンを摂取すると、その苦味強度はサリシン単独の時に比べ、有意に上昇した。

今回我々は、hT2R16 の大量精製とその鶏卵抗体の作成、及び抗体の苦味感受性への影響を調べた。その結果、抗 hT2R16 抗体は事前摂取によりサリシンの苦味強度を上昇させた。今後このメカニズムについてはさらなる検討を進める必要がある。

bitter taste receptor, antibody, bitter sensitivity

発表責任者：林　由佳子（yhayashi@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A06p13
講演日時：3 月 18 日 17:20～ A 校舎 06 会場

# 苦味物質の反復摂取による口腔内苦味蓄積性の検討

# Evaluation of bitter taste accumulation by repeated exposure of bitter solution

○横田 光平[1]、村 絵美[1,2]、大原 英之[1]、松宮 健太郎[1]、松村 康生[1]、林 由佳子[1] ([1]京大院農、[2]サントリーグローバルイノベーションセンター)
○ Kohei YOKOTA[1], Emi MURA[1,2], Hideyuki OHARA[1], Kentaro MATSUMIYA[1], Yasuki MATSUMURA[1], Yukako HAYASHI[1] ([1]Grad. Sch. Agriculture, Kyoto Univ., [2]Suntory Global Innovation Center)

【背景と目的】自然界において、苦味を呈する毒物は多い。そのため、動物にとって苦味とは食物の毒性を示すシグナルであり、苦味を呈する食物の摂取は本能的に忌避される。しかし、人間にとって、苦味は必ずしも忌避される味とはいえない。ビールやコーヒーなどの嗜好品の中には苦味を呈するものが多く存在し、人々は食経験に伴って、これらの苦味を呈する食品を好むようになる。

その一方で、薬品に使用されるような苦味物質には口腔内に長く苦味がとどまり、強い嫌悪感を引き起こすものが存在する。このような物質は、何度味わっても嗜好されにくい。

このことから、苦味には食品として嗜好される受諾性の苦味と、薬品や毒物にみられる忌避性の苦味が存在すると考えられる。

【方法】苦味の嗜好性には、口腔内における苦味の蓄積性が関与していると考え、苦味溶液を反復して摂取した際の口腔内における苦味強度の変化を官能評価によって測定した。

官能評価は京都大学の学生によって行われた。試験参加者は 15mL の苦味溶液を 5 秒間口に含み、苦味と渋味の強度について評価する。評価は 0 から 20 までの連続した数字の記された 20 ポイントスケールによって行われ、参加者は味の強度が大きいほど大きな数字に○を付けて回答するように指示される。溶液を口に含み、味を評価するという試行を、試行間に 30 秒ずつ時間をおいて合計 30 回連続して行い、口腔内における苦味と渋味の強度変化を測定した。この反復摂取試験を複数種類の苦味物質を用いて行い、物質ごとの苦味および渋味蓄積性の比較検討を行った。

【結果と考察】反復摂取による苦味や渋みの蓄積性は物質によって異なるということが明らかになった。また、受諾性の高さと苦味の口腔内蓄積性の大きさには相関が見られなかった。この結果より、苦味の蓄積性は物質の忌避性を反映せず、ヒトは蓄積性の大きい物質でも日ごろの食生活において好んで摂取しているということが分かった。

bitter avoidance, repeated exposure, sensory evaluation

講演番号：2A06p14
講演日時：3 月 18 日 17:35～ A 校舎 06 会場

# 加齢に伴うマウスの味覚受容の変化

# Aging-related changes in taste perception of mice

○冷水 里穂子、林 由佳子（京大農）
○Rihoko SHIMIZU, Yukako HAYASHI (Kyoto Univ.)

【背景と目的】老年期の味覚が若い頃のそれと異なることは明らかである。しかし、その味覚変化が味情報伝達のいずれかの段階における形態や機能の変化によってもたらされたものであるのか、あるいは生理・栄養状態の変化に起因する欲求に基づくものであるのか、あるいはまたその両方なのかは明らかではない。本研究では加齢に伴う味覚の嗜好性の変化と、その変化の要因たりうる味覚受容機構の変化の解明を目的とし、マウスを用いて検討を行った。尚、この研究の一部は浦上食品・食文化振興財団助成金より行われた。

【方法】絶水後のマウス(若齢: 8～14週齢、高齢: 14～17月齢、共にC57BL/6J ♀) に味溶液と水の二種類のボトルを10分間呈示して自由に飲水させ、各味溶液の嗜好率(＝味溶液飲水量／総飲水量)を算出した。味溶液には各濃度のスクロース(甘味)、塩化ナトリウム(塩味)、クエン酸(酸味)、グルタミン酸ナトリウム(うま味)、塩酸キニーネ(苦味)溶液と、ENaC(上皮性ナトリウムイオンチャネル)阻害剤アミロライドを10 μM添加した塩化ナトリウム溶液を用いた。また、特定の味質を経験させた直後のマウスに塩化リチウムを腹腔投与して内臓不快感を生じさせ、その味質に対して嫌悪学習を成立させた。その後、同様に嗜好率を測定し、味認識の変化の有無を検討した。一方、若齢と高齢のマウスの舌組織での免疫化学染色によって、各味質を受容する味細胞の分布を比較した。4% PFAで灌流固定したマウスの舌の有郭乳頭付近の凍結切片を作成し、それらに対して各種マーカータンパク質の一次抗体および蛍光標識された二次抗体を免疫化学的に反応させ、共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った。一次抗体には甘味・うま味・苦味を受容するⅡ型味細胞マーカーPLCβ2抗体と酸味受容味細胞マーカーCAR-4抗体を用いた。

【結果と考察】高齢群は 100 mM 以上の高濃度の塩化ナトリウム溶液を嗜好する傾向にあり、とくに 300 mM 塩化ナトリウム溶液に対する高齢群の嗜好率は若齢群と比べて有意に高かった。しかし、アミロライドを添加した 100～300 mM 塩化ナトリウム溶液に対する高齢群の嗜好率は、アミロライド添加時の塩化ナトリウム溶液および塩化ナトリウム単独の溶液に対する若齢群の嗜好率と同程度であった。よって、低濃度塩味の受容に寄与して薄い塩味に対する嗜好性を生じさせると考えられている ENaC を介する塩味需要経路が、高齢群の高濃度塩味嗜好に寄与している可能性が示唆された。また、高齢群は無機酸である塩酸を嗜好せず、有機酸であるクエン酸を嗜好した。加齢時の生理状態が酸味物質間の嗜好性の違いに反映された可能性がある。このクエン酸溶液の嗜好率上昇は、高齢群に甘味で嫌悪学習を成立させると消失した。よって、高齢群がクエン酸の味質を一部甘味として認識していると考えられる。免疫組織化学染色の結果から、味蕾一つあたりのⅡ型味細胞と酸味受容味細胞の平均細胞数に両群で差はなく、両群において用いた二種類のマーカータンパク質の同一味細胞での共発現も観察されなかった。したがって、高齢群のクエン酸の酸味と甘味の混同は、末梢の味細胞での味受容の段階で起こっているのではないと考えられる。

taste, aging, preference

講演番号：2A06p15
講演日時：3 月 18 日 17:50～ A 校舎 06 会場

# 小型魚類メダカを用いた苦味受容機構解析系の構築

# Construction of an assay system for the bitter taste reception mechanism by use of medaka as small fish species

○高橋 健[1]、阿部 啓子[1,2]、岡田 晋治[1] ([1]東大院農生科・応生化、[2]神奈川科学技術アカデミー)
○Ken TAKAHASHI[1], Keiko ABE[1,2], Shinji OKADA[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo, [2]KAST)

【背景・目的】味を呈する化学物質（味物質）は味蕾で受容され、その情報は味神経を通じて脳に伝えられる。味蕾細胞における味物質への応答のメカニズムを解明するために、現在までパッチクランプ法を用いた解析や $Ca^{2+}$イメージングなど様々な実験手段がとられてきた。しかし、これらの測定方法の実施には高価な解析装置が必要であり、手技の習熟が難しく、また、いずれも適切な場所を適切なタイミングで観察するという困難さがある。そこで本研究では、蛍光タンパク質 CaMPARI を用いて、蛍光の変化で味物質応答細胞を同定する手法の確立を目指す。CaMPARI は、UV 照射下で細胞の興奮に伴って $Ca^{2+}$濃度が高まると蛍光が緑色から赤色へと永続的に変化する特徴を持つ。この手法では、刺激に応答した細胞が永続的に標識され、組織切片の観察により広い領域で同定できるという利点がある。脊椎動物のモデル生物の一つである小型魚類メダカは、体の透明性が高く、外部から当てた UV が体内まで透過するため、味刺激への応答を CaMPARI で検出する系に適したモデルであると考えられる。

本研究では、メダカにおいてこの CaMPARI を用いた味覚受容解析系の確立を目指し、人工苦味物質デナトニウムが唯一の既知リガンドであるメダカ苦味受容体 mfT2R1 の自然界のリガンドを探索することを目的としている。

【方法・結果】mfT2R1 発現細胞での味刺激応答を観察するために、mfT2R1 発現細胞特異的に CaMPARI を発現誘導した遺伝子改変メダカ（TG メダカ）を作出した。発現誘導には、mfT2R1 の遺伝子上流 2.3 kbp の配列をプロモーターとして用いた。メダカゲノムへの挿入効率を高めるために *I-SceI* 切断サイトを導入したプラスミドを構築し、マイクロインジェクション法によってメダカ受精卵に目的遺伝子を導入した。得られた TG メダカ稚魚を刺激を与えていない定常状態で観察し、mfT2R1 発現細胞に発現した CaMPARI 由来の緑色蛍光が口唇の味蕾に観察できる個体を取得中である。

今後、取得した TG 個体に対して、UV を照射しながらデナトニウムを投与する。その後、薄切切片を作製して、味蕾の mfT2R1 発現細胞に発現誘導された CaMPARI の蛍光の変化を観察する。また、TG メダカの系統化を行い、mfT2R1 の自然界のリガンド探索実験を進める予定である。

taste, medaka fish, bitter

講演番号：2A06p16
講演日時：3 月 18 日 18:05～ A 校舎 06 会場

煮干製造における低温乾燥オリーブ葉処理の魚臭および苦味低減効果
The fish odor and bitterness can be suppressed by the addition of olive leaves in *Niboshi* processing
○松原 保仁、柴﨑 博行（香川県産業技術センター・発酵食品研究所）
○Yasuhito MATSUBARA, Hiroyuki SHIBASAKI (Kagawa Prefectural Industrial Technology Research Center, Fermentation & Food Research Institute)

【目的】煮干（イリコ）は、生のカタクチイワシを約5%の塩水中で煮熟し乾燥して製造される。一般的に、イリコは保存中に頭および内臓部分の脂質が酸化されることで魚臭と苦味が増すため、良質な出汁を取る場合には頭部と内臓を除去して使用する必要がある。そのため、家庭では簡便な顆粒状のだし製品が使われることが多くなり、イリコの使用量は減少傾向にある。今回、我々は低温乾燥オリーブ葉（OL）を添加した塩水中で煮熟処理することでイリコの魚臭と苦味が低減することを見出し、オリーブイリコ®[1]の製造方法を開発した。そこで、通常のイリコに対してオリーブイリコの魚臭と苦味を評価することで、その有効性について検討した[2]。

【方法】オリーブイリコは、塩水の重量 800kg に対して OL 0.8kg（0.1%相当）～ 1.6kg（0.2%相当）をメッシュ袋に入れて煮熟釜に投入し、約 5%の塩水中で３分間煮熟し、45℃, 17～20 時間乾燥して製造した。魚臭は、パネラーがイリコを嗅ぐことで官能評価し、粉末化したイリコの臭気成分について GC-MS 分析を行った。苦味は、イリコを咀嚼することで官能評価し、イリコ出汁を調製して味認識装置による苦味、渋味の評価を行った。

【結果・考察】官能評価の結果、オリーブイリコは通常のイリコに比べて魚臭および苦味の低減化が認められ、統計的にも有意差があった。GC-MS 分析の結果、OL 処理により魚臭成分のトリメチルアミン及びヘキサナールのほか、酢酸、ブタン酸、ヘキサン酸、オクタン酸、デカン酸等のカルボン酸の減少が認められ、魚臭の官能評価結果を支持するものであった。味認識装置を用いたイリコ出汁の評価においても、オリーブイリコの出汁は苦味、渋味の強度が相対的に低く、官能評価の結果と一致した。以上のことから、OL はカタクチイワシを原料とする煮干魚の製造工程に使用することで魚臭や苦味を低減する素材として有用であると考えられた。また、オリーブイリコは、頭、内臓を取り除く必要がないため、調理時間を短縮できる新しい煮干製品として利用拡大が期待できた。

1）北山正夫、商標登録5837429（オリーブイリコ）
2）松原保仁、柴﨑博行、特願2015-241646（煮干魚の製造方法）

fish odor, bitterness, olive leaves

発表責任者：松原　保仁（we1557@pref.kagawa.lg.jp）

講演番号：2A07a01
講演日時：3 月 18 日 09:20～ A 校舎 07 会場

海産物由来スフィンゴ脂質セラミドアミノエチルホスホン酸の食品機能性の評価
Evaluation of ceramide 2-aminoethylphosphonate (CAEP), a marine sphingolipid as a food functional component
○友永 奈美[1]、都築 毅[2]、真鍋 祐樹[1]、菅原 達也[1] ([1]京大院農、[2]東北大院農)
○Nami TOMONAGA[1], Tsuyoshi TSUDUKI[2], Yuki MANABE[1], Tatsuya SUGAWARA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Tohoku Univ.)

【目的】
近年、スフィンゴ脂質の食品機能性が注目されており、経口摂取による皮膚バリア機能改善作用なども報告されている。セラミドアミノエチルホスホン酸（CAEP）は主に海産無脊椎動物に含まれているスフィンゴ脂質であり、その構成成分であるスフィンゴイド塩基には哺乳動物にはほとんど存在しない特徴的なトリエン型も多く存在する。CAEP は頭足類や貝類に含まれており、日常的に摂取されているものの、食品成分としてほとんど評価されていなかった。そのため、我々はこれまで小腸における CAEP の消化を検討し、経口摂取された CAEP はスフィンゴイド塩基へと分解されることを明らかとした。本研究では、食品成分としての CAEP の機能性を評価のするため、生体内への吸収および経口摂取による皮膚バリア機能への影響を明らかにすることを目的とした。
【方法】
アメリカオオアカイカの皮から抽出した総脂質から CAEP を精製し、以下の実験に用いた。ラットリンパ管カニューレ法を用いて、CAEP の生体内への吸収を評価した。リンパ液中に含まれるスフィンゴイド塩基は *o*-フタルアルデヒド誘導体化し、蛍光 HPLC 法を用いて測定した。さらに、皮膚バリア機能への影響を評価するため、アトピー性皮膚炎様モデルマウスを用いた実験を行った。ヘアレスマウスにマグネシウム欠乏飼料（HR-AD）を与え、アトピー様皮膚炎を誘発した後、0.1%CAEP 添加飼料で 6 日間飼育した。このとき、経皮水分蒸散量（TEWL）および角層水分量を測定し、皮膚の状態を評価した。
【結果と考察】
CAEP 投与後ラットのリンパ液中からトリエン型を含む CAEP 由来のスフィンゴイド塩基が検出された。これまでの知見と合わせて、スフィンゴイド塩基へと分解された CAEP は、少なくともその一部が生体内へと吸収されることが明らかとなった。さらに、アトピー様皮膚炎を発症したマウスは CAEP の経口摂取によって、対照群と比べて TEWL が有意に減少し、角層水分量が有意に増加した。以上の結果より、経口摂取された CAEP の一部はスフィンゴイド塩基として生体内へと吸収され、皮膚バリア機能改善作用に寄与することが示唆された。

sphingolipids, lymph, skin

発表責任者：菅原達也（sugawara@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A07a02
講演日時：3 月 18 日 09:35～ A 校舎 07 会場

# 哺乳動物における緑藻由来シフォナキサンチンの代謝産物の同定

# Identification of green algal siphonaxanthin metabolites in mammals

○新多 智明[1]、李 卓思[1]、市原 美里[1]、真鍋 祐樹[1]、眞岡 孝至[2]、菅原 達也[1] ([1]京大農、[2]生産開発研)

○Tomoaki NITTA[1], Zhousi LI[1], MISATO ICHIHARA[1], Yuki MANABE[1], Takashi MAOKA[2], Tatsuya SUGAWARA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Research Institute for Production Development)

【目的】シフォナキサンチン (spx) はミルやクビレズタなどの緑藻に含まれるカロテノイドであり、抗肥満作用や血管新生抑制作用などについて、他のカロテノイドよりも強い生物活性を有していることから、新規食品機能成分として有効利用が期待されている(1, 2)。しかしながら、spx の生体利用性や生体内代謝についての知見はほとんどない。ルテインなどいくつかのカロテノイドは哺乳動物の生体内で酸化的に代謝されることが報告されているが、spx も生体内で同様に代謝されるかは不明である。そこで本研究では spx の生体内代謝を調べることを目的とし、培養細胞と動物実験モデルを用いて検討した。

【方法】小腸上皮様に分化させたヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞にミセル化した spx を添加し、一定時間後の代謝産物を LCMS-IT-TOF を用いて解析した。また、spx を含む精製飼料で ICR マウスを 16 日間飼育し、血清および各種臓器に含まれる代謝産物を同様に解析した。さらに、ICR マウスおよび SD ラット肝臓ホモジネートを用いて *in vitro* で spx 代謝産物を調製し、NMR 解析を用いて化学構造の決定を試みた。

【結果と考察】Caco-2 細胞を一定時間 spx で処理した後、LCMS-IT-TOF で解析したところ、2 種類の代謝産物と思われるピークが検出された。また、spx 摂食マウスの血清および各種臓器からこれら 2 種類を含む 4 種類の代謝産物と思われるピークが検出された。HPLC における保持時間と MS スペクトルから、マウス体内から検出されたピークのうちの 1 種類は脂肪酸エステル体と推測された。また、残り 3 種類のピークは MS スペクトルと吸収スペクトルから spx の酸化的代謝産物であると考えられた。肝臓ホモジネートを用いた *in vitro* 酵素反応によって調製した spx 代謝産物を単離精製し、NMR 解析に供したところ、Caco-2 細胞およびマウス生体内で検出されたピークのうちの 1 つは、3’位の水酸基がケト基に変換された 3’-oxo-spx であることがわかった。

以上の結果から、哺乳動物において経口摂取された spx はルテインと同様、酸化的に代謝されることが示された。

（1）*Journal of Nutrition*, 2015, 145, 490-498.
（2）*Molecular and Cellular Biochemistry*, 2013, 380, 1-9.

carotenoid, metabolism, NMR

講演番号：2A07a03
講演日時：3 月 18 日 09:50～ A 校舎 07 会場

# 米糠酵素処理物を用いたフェルラ酸のバイオアベイラビリティの向上と体内動態の解析

# Increase in the bioavailability of ferulic acid using the enzyme treated rice bran

○大松 達也[1]、井上 拓実[1]、今井 裕介[1]、尼子 みどり[1,2]、鈴木 志保[1,2]、前田 浩明[3]、北村 進一[1]
([1]大阪府大院 生命環境、[2]（有）IPE、[3]（株）オリジン生化学)
○Tatsuya OMATSU[1], Takumi INOUE[1], Yusuke IMAI[1], Midori AMAKO[1,2], Shiho SUZUKI[1,2], Hiroaki MAEDA[3], Shinichi KITAMURA[1] ([1]Osaka Prefecture Univ., [2]IPE Inc., [3]Origin Biochemical inc.)

【背景】

フェルラ酸には，抗酸化作用，動脈硬化の改善やアルツハイマー予防作用などの多くの生理活性があることが報告されている．しかし，フェルラ酸は水への溶解度があまり高くなく，バイオアベイラビリティ（生体内利用率）が低いことが問題としてある．近年，オリゴ糖を分散剤として用いることにより，機能性化合物の溶解度を向上させ吸収性の改善を試みる研究が注目されている．本研究では，紫黒米米糠酵素処理物を用いてフェルラ酸の溶解度を向上させ，バイオアベイラビリティを高めることを試みた．さらに，吸収されたフェルラ酸の体内動態の解析も行った．

【方法と結果】

まず，紫黒米米糠を cellulotin T2（*Tricoderam viride* 由来）を用いて 4 時間酵素処理し，セルラーゼ等の酵素により分解した水溶性酵素処理米糠サンプルを得た．このサンプルについて HPLC-PAD および HPLC-UV を用いて分析すると，重合度 3 以上のオリゴ糖および様々なフェノール性化合物が検出された．この酵素処理サンプルを用いてフェルラ酸の溶解度の向上を試みた．サンプル濃度 10%（*w/v*）において，フェルラ酸の溶解度は 7.2 倍向上し，分散・溶解剤としての機能が確認された．（以下，この酵素処理サンプルを分散剤として表記する．）

次に，小腸上皮モデルとして知られている Caco-2 細胞単層膜を用いて，フェルラ酸の膜透過性の向上について検討した．Caco-2 細胞単層膜にフェルラ酸分散液（分散剤濃度 1.0%（*w/v*））を添加し，30, 60, 90 分後におけるフェルラ酸の透過量を定量した．透過量をもとに膜透過係数 $P_{app}$ を算出した．分散剤を添加したフェルラ酸分散液を用いると，無添加の分散液に比べて $P_{app}$ の値が 1.3 倍向上し吸収性の向上が示唆された．

Caco-2 細胞単層膜を用いた実験より小腸における吸収性の向上が確認されたため，*in vivo* におけるバイオアベイラビリティの向上を調べた．フェルラ酸分散液（分散剤濃度 10%（w/v））をラット（Wistar, 雄，11 週齢）に経口投与し，投与後，0，3，5，8，10，15，20，25，30，40，50，60 分後に尾静脈より採血を行った．得られた血漿中のフェルラ酸濃度変化を調べると，投与後 6 分以内に血中濃度が最大に達し，60 分以内に代謝・排泄されることが分かった．また，バイオアベイラビリティの指標となる血中濃度 - 時間曲線下面積（$AUC_{0\to\infty}$）は，control 群に比べて 3.4 倍向上した．

bioavailability, ferulic acid, solubility

発表責任者：大松達也（omatsu@bioinfo.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：2A07a04
講演日時：3 月 18 日 10:05～ A 校舎 07 会場

# 大麦品種 BARLEYmax の摂取がラットの盲腸および結腸の腸内発酵に及ぼす影響

# Effect of barley cultivar BARLEYmax intake on the cecal and colonic fermentation in rats.

○青江 誠一郎[1]、山中 千恵美[1]、北薗 英一[2]、妹脊 和男[2] ([1]大妻女子大家政、[2]帝人株式会社)
○Seiichiro Aoe[1], Chiemi Yamanaka[1], Eiichi Kitazono[2], kazuo Imose[2] ([1]Otsuma Women's Unuv., [2]TEIJIN Ltd.)

【目的】

大麦品種 BARLEYmax は、オーストラリア連邦科学産業研究機構が開発した非遺伝子組み換え大麦で、一般の大麦に比べて水溶性食物繊維である β－グルカンに富み、さらに発酵性の食物繊維であるフルクタンおよびレジスタントスターチを含む。本研究では、これら発酵性食物繊維の発酵特性の違いに着目し、BARLEYmax の摂取がラットの盲腸および結腸の腸内発酵に及ぼす影響を高 β－グルカン品種の大麦と比較した。

【方法】

大麦品種として、BARLEYmax(*Tantangara*)および BG ファイバー（カナダ産）を用いた。AIN-93G 組成の飼料を対照（以下 CO）とし、BARLEYmax（以下 BM）および BG ファイバー（以下 BG）を総食物繊維として 5%となるようにコーンスターチと置換した。5 週齢の SD 系雄ラットを 1 群 8 匹の 3 群に群分けし、試験試料を 4 週間給餌した。解剖時に盲腸、近位結腸（上部 1/2 部位)、遠位結腸（下部 1/2 部位）を摘出し、内容物より有機酸を抽出後、誘導体化して GC/MS にて有機酸濃度を測定した。また、盲腸内要物および試験最終日に採取した新鮮便より DNA を抽出し、リアルタイム PCR 法にて優勢菌のコピー数を測定し、菌数が既知の標準菌株を用いて作成した検量線より g あたりの腸内細菌数を算出した。

【結果】

ラットの成長は各群間で同等であったが、内容物を含む盲腸重量は BM 群が CO 群、BG 群に比べて有意に重かった。内容物 1g あたりの盲腸内有機酸濃度は、BM 群が最も高く、次いで BG 群が高かった。いずれも、CO 群と有意差が認められた。一方、遠位結腸では、BM 群のみが CO 群と比べて有意に高い濃度であった。短鎖脂肪酸では、酢酸および酪酸の産生量が CO 群と比べて多かった。腸内細菌数は、盲腸内要物 1g あたりの *Bifidobacterium* 属菌数が CO 群、BG 群と比べて有意に多かった。糞便 1g あたりでは、*Bifidobacterium* 属菌数が、BM 群＞BG 群＞CO 群の順に多く、各群間で有意差が認められた。

以上の結果、BARLEYmax は、ラットの盲腸～遠位結腸の全域に食物繊維が到達し、発酵を促すことが認められた。特に、遠位結腸で短鎖脂肪酸が増加したのは BM 群のみであったことから、BM と BG の発酵性の差は、フルクタン、レジスタントスターチの影響と考えられた。

barley, fermentation, short-chain fatty acid

発表責任者：青江誠一郎（s-aoe@otsuma.ac.jp）

講演番号：2A07a05
講演日時：3 月 18 日 10:20～ A 校舎 07 会場

# クエン酸による小腸からのカルシウム吸収促進作用とそのメカニズム解析

# Enhancement of intestinal calcium absorption by citrate, and elucidation of its mechanism

○生谷 隆麿[1]、齋藤 弘貴[1]、瀬川 修一[1]、平光 正典[2]、井上 孝司[2]、青江 誠一郎[3]、土屋 陽一[1] ([1]サッポロホールディングス(株) 価値創造フロンティア研究所、[2] ポッカサッポロフード&ビバレッジ(株) 新規基盤開発研究所、[3]大妻女子大学 家政学部 食物学科)
○Ryuma IKUTANI[1], Hiroki SAITO[1], Shuuichi SEGAWA[1], Masanori HIRAMITSU[2], Takashi INOUE[2], Seiichiro AOE[3], Yoichi TSUCHIYA[1] ([1]SAPPORO HOLDINGS LTD., [2]POKKA SAPPORO Food & Beverage Ltd., [3]OTSUMA WOMEN'S UNIVERSITY)

【背景】レモンはクエン酸が多く含まれる果実として知られており、クエン酸はミネラルなどの吸収を促進する効果があるといわれている。我々のグループではカルシウムを豊富に含むレモン果汁飲料を継続摂取することによって中高年女性の骨密度を改善することを見出した。そこで、本研究ではこの骨密度改善効果がクエン酸のキレート作用によるカルシウム吸収促進効果によるものであると考え、マウスと細胞を用いた検討を行った。
【方法】0、1、5 %のクエン酸溶液に 1 g/100mL となるように炭酸カルシウムを加えた溶液をそれぞれ 8 週齢の雄性 ddy マウスに経口投与した。投与して 1 時間後に解剖を行い、門脈と腹部大静脈の血清中カルシウム濃度と小腸組織中のカルシウム量を測定した。また、十分に分化したヒト結腸癌由来細胞 Caco-2 を用い、クエン酸ナトリウム添加後 48 時間後に細胞を回収し、カルシウム腸管輸送に関わる遺伝子群の mRNA を測定した。
【結果】0 %クエン酸のカルシウム溶液投与群はカルシウム溶液非投与群に比べて血清中のカルシウム濃度の増加はみられなかったが、5 %クエン酸のカルシウム溶液投与群は 0 %クエン酸のカルシウム溶液投与群に比べて有意に血清中のカルシウム濃度が上昇し、小腸組織中のカルシウム量も増加傾向を示した。Caco-2 細胞にクエン酸ナトリウムと塩化カルシウムを添加したところ、側底側に発現し、上皮細胞中からカルシウムを排出する PMCA1 (Plasma membrane calcium ATPase 1) の発現が濃度依存的に増加した。一方で VDR (Vitamin D receptor) を介してカルシウムを細胞内に輸送するといわれている CaT1 (calcium transport protein 1) や Calbindin-D9k の発現はクエン酸ナトリウムの添加により減少していた。
これらの結果からクエン酸はキレート作用によってカルシウムの可溶性を高め、小腸からのカルシウムの吸収を促進していることが示唆された。

citrate, calcium absorption, Caco-2 cell

発表責任者：生谷隆麿（ryuma.ikutani@sapporoholdings.co.jp）

講演番号：2A07a06
講演日時：3 月 18 日 10:45～ A 校舎 07 会場

# 腹部大動脈瘤の進展・破裂に及ぼす高脂肪食の影響評価

# The effect of high fat diet on development of abdominal aortic aneurysm

○橋本 佳祐、久後 裕菜、財満 信宏、森山 達哉（近大農院）
○Keisuke Hashimoto, Hirona Kugo, Nobuhiro Zaima, Tatsuya Moriyama (Kindai Univ)

【目的】腹部大動脈瘤(Abdominal aortic aneurysm : AAA)は腎動脈下の大動脈が進行的に拡張する血管疾患である。AAA 進展の危険因子として、喫煙、高血圧、年齢、動脈硬化などが挙げられる。無自覚・無症状のまま進行するが、破裂した際の致死率は非常に高い。瘤径が大きくなるほど、破裂のリスクは増加し、55mm 以上になると人工血管置換術かステントグラフト内挿術の手術適応となる。現時点で AAA の進展を抑制する有効的な薬学的・食事的療法は開発されていない。食生活が AAA の進展・破裂に与える影響食生活が AAA 進展・破裂に与える影響についての研究報告はほとんどなく、これを明らかにすることで患者に対する食生活の提案をすることに繋がる。そこで、動脈硬化、高脂血症、肥満などの危険因子である脂肪分の過剰摂取に着目した。本研究では、血管壁循環不全誘導 AAA モデルラットを用いて、高脂肪食が AAA の進展・破裂に及ぼす影響を評価することを目的とした。
【方法】6 週齢雄 SD ラットをコントロール食（ラード 1.9％含有）群と高脂肪食（ラード 31.5％含有）群に分け、餌と水を自由摂取させた。飼育開始 1 週間後に腹部大動脈結紮処置を行い、AAA を誘導した。4 週間後に、形成された腹部大動脈瘤径の測定を行った。摘出大動脈はパラホルムアルデヒド(PFA)固定後に凍結し、病理評価を行った。
【結果と考察】コントロール群と比較して高脂肪食群において破裂リスクが 415%有意に増加しており、拡張領域において高脂肪食群で有意に血管径が増加した。高脂肪食群において血管壁の肥厚が有意に促進された。両群の血管壁拡張領域において脂肪細胞の蓄積が確認されたが、高脂肪食群において脂肪細胞の数・面積が有意に増加した。そこで、脂肪細胞が存在する領域と存在しない領域に分けて解析を行った。血管壁の強度を保つ膠原線維の陽性面積は脂肪細胞の非存在領域と比較して存在領域において有意に減少していた。細胞外マトリックス分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)-2,9,12 は脂肪細胞の非存在領域と比較して存在領域において有意に増加した。MMP を産生する炎症細胞であるマクロファージと単球の走化因子である MCP-1 においても脂肪細胞の非存在領域と比較して存在領域で有意に増加した。
脂肪細胞存在領域では非存在領域と比較してマクロファージの浸潤や MMP 産生が増加しており、高脂肪食群ではコントロール群と比較して脂肪細胞が増加・肥大化していた。これらのことから高脂肪食群では血管壁における脂肪細胞が占める領域が多くなり、炎症が促進したことで、破裂のリスクが増加したと考えられる。本研究において、脂肪分の過剰摂取が AAA の進展と破裂リスクを促進させたことから、脂肪分の摂取を控えることで脂肪細胞の増加を防ぎ、AAA の進展と破裂を予防する可能性が示唆された。

abdominal aortic aneurysm, high fat diet, adipocyte

発表責任者：橋本佳祐（kei.hashimoto1204@gmail.com）

講演番号：2A07a07
講演日時：3 月 18 日 11:00～ A 校舎 07 会場

高食塩負荷高血圧自然発症ラットにおける血管機能低下等に対する茶品種「やぶきた」「そうふう」「サンルージュ」の飲用による保護効果の比較
Comparison of the Effects of "Yabukita", "Sofu",and "Sunrouge" (*Camellia sinensis* L.) on Vascular Functions in High-Salt Diet-Fed Spontaneously Hypertensive Rats
○物部 真奈美、野村 幸子、江間 かおり、山本（前田） 万里、根角 厚司 (農研機構)
○Manami MONOBE, Sachiko NOMURA, Kaori EMA, Mari MAEDA-YAMAMOTO, Atsushi NESUMI (NARO)

日本における大規模コホート研究で、緑茶の習慣的飲用と心臓病、脳血管疾患と呼吸器疾患による死亡リスクの減少に相関性があることが示され、緑茶の主要な生理活性成分であるカテキン類（特にガレート型カテキン)、カフェイン、テアニンの関与が示唆されている。しかし、緑茶には他にも生理活性成分が含まれており、それらの関与についてはほとんど研究されていない。そこで、ガレート型カテキンとカフェイン以外の成分としてノンガレート型カテキン，アントシアニン，ケルセチン配糖体含量が異なる茶品種「やぶきた」，「サンルージュ」，「そうふう」の浸出液を高食塩負荷高血圧自然発症ラットに自由摂取させ、成分構成の異なる品種の違いが血管機能等に与える影響を調べた。全身性の血管内皮機能の指標として尿中 NOx、全身性の酸化ストレス指標として尿中 8-OHdG 濃度を測定した。また、部位別には胸部大動脈について血管内皮の NO 産生機能に関係する eNOS と sGC の発現量の変化を調べた。その結果、すべての緑茶摂取群で高食塩負荷による尿中 NOx の減少が有意に抑えられた。高食塩負荷による NOx 減少抑制の考えられる原因として、酸化ストレスの軽減と eNOS 活性の上昇が報告されているが、高食塩負荷による酸化ストレスを軽減できたのは「そうふう」のみであり、「やぶきた」「サンルージュ」にその効果は認められなかった。そのため、３品種に共通して認められた高食塩負荷による NOx の減少抑制効果には酸化ストレス軽減作用の関与は少ないと考えられる。さらに、胸部大動脈については、高食塩負荷により sGC の発現量が下がったが、すべての緑茶摂取群でその低下が抑えられた。高食塩負荷により sGC 低下の代償として eNOS 発現量が増加することが報告されているが、「やぶきた」と「そうふう」摂取群では高食塩負荷による eNOS 発現量の増加がさらに増強された。一方、「サンルージュ」摂取群は水摂取群と同レベルの eNOS 発現量の増加であり、「やぶきた」と「そうふう」摂取群で見られたようなさらなる増強効果は認められなかった。アントシアニンには eNOS 発現量を増加させる効果があることが報告されているが、アントシアニンを含む「サンルージュ」摂取群では発現量の増強は確認されなかった。「サンルージュ」のもう一つの特徴はノンガレート型カテキンが少ないことであり、「やぶきた」と「そうふう」による胸部大動脈 eNOS の発現量の増強には緑茶の主要なノンガレート型カテキンである EGC が関与している可能性がある。

tea cultivars (Camellia sinensis L.), SHR, vascular functions

講演番号：2A07a08
講演日時：3 月 18 日 11:15～ A 校舎 07 会場

# 緑茶カテキン EGCG の血栓症予防因子 TFPI 発現促進作用とそのメカニズム

# Enhancing effect of green tea polyphenol EGCG on TFPI expression and its mechanism

○十時 繁幸、高倉 卓也、上崎 浩克、山下 修矢、熊添 基文、立花 宏文（九州大学大学院 農学研究院 生命機能科学部門）
○ Shigeyuki Totoki, Takuya Takakura, Hirokatsu Kanzaki, shuya Yamashita, Motofumi Kumazoe, Hirofumi Tachibana (Department of Bioscience and Biotechnoloy, Faculty of Agriculture, Kyushu Univ.)

【背景および目的】

血栓の形成により血管が閉塞する病態、すなわち血栓症に起因する心血管疾患は、全世界における死因の上位を占める疾患であるため、血栓形成の防止としての血液凝固の抑制が重要である。一方、緑茶の摂取は心血管疾患のリスクを低下させることが報告されており、我々はこれまでに、緑茶カテキンの主要成分である（－）-epigallocatechin-3-*O*-gallate（EGCG）が外因系血液凝固を制御するとともに動脈硬化症抑制因子として知られる Tissue factor pathway inhibitor（TFPI）の発現を誘導することを見出している。そこで本研究では、EGCG の TFPI 発現誘導メカニズムの解明を目的とした。

【方法および結果】

11 週齢 C57BL/6 雄性マウスに 7 日間 EGCG を経口投与した後、希釈プロトロンビン時間を測定して血漿凝固活性を評価した。その結果、EGCG 投与群の血漿凝固時間は Control 群に比べ高値を示した。血漿中の TFPI 濃度を ELISA 法により測定した結果、EGCG 投与群の血漿 TFPI 濃度は Control 群と比べ高値を示した。大動脈における TFPI の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法にて測定したところ、EGCG 投与群において、TFPI の mRNA 発現量は Control 群に比べ高値を示した。続いて、EGCG の TFPI 発現促進作用機序についてヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC を用いて検討した。我々はこれまでに、EGCG が細胞膜上の標的分子である 67-kDa laminin receptor（67LR）と結合し、多彩な生理作用を発揮することを明らかにしてきた。そこで、HUVEC を抗 67LR 抗体で前処理し 67LR の関与を検討したところ、EGCG 処理により HUVEC の TFPI 遺伝子発現量は増加したが、抗 67LR 抗体の処理下では、EGCG は TFPI 発現に影響を与えなかった。67LR 下流の作用機序に関して検討した結果、EGCG 処理は、HUVEC において Akt（Ser473）および eNOS（Ser1177）のリン酸化ならびに cGMP の産生を促進した。Akt 阻害剤により EGCG の eNOS リン酸化促進作用は消失した。eNOS 阻害剤および sGC 阻害剤で処理した HUVEC においては、EGCG の TFPI 発現促進作用は観察されなかった。以上の結果より、EGCG は 67LR/Akt/eNOS/sGC/cGMP 経路を介して TFPI の発現を促進することが明らかとなった。

EGCG, 67-kDa laminin receptor, Tissue factor pathway inhibitor

講演番号：2A07a09
講演日時：3 月 18 日 11:30～ A 校舎 07 会場

マイタケによるヒト臍帯静脈内皮細胞の血管新生促進作用
*Grifola frondosa* (Maitake mushroom) promotes angiogenic activity in human umbilical vein endothelial cells.
○清水 崇光[1]、小林 仁[1]、大内 謙二[1]、都築 毅[2] ([1]ホクト、[2]東北大院農)
○TAKAMITSU SHIMIZU[1], HITOSHI KOBAYASHI[1], KENJI OUCHI[1], TSUYOSHI TSUDUKI[2] ([1]Hokuto Corp., [2]Grad. Sch. Agri. Sci., Tohoku Univ.)

【目的】
心筋梗塞や脳梗塞および床ずれなどは血栓や血管の圧迫により血流が滞り、組織が虚血状態になることで生じる。このような血流不足による諸症状は血管新生を促進することで改善されるものの、これを促進する物質は生体内増殖因子以外にほとんど知られていない。虚血性疾患や創傷治癒など血管新生治療が望まれる領域は広いが、現在行われている血管新生治療は薬剤や増殖因子などの血管新生促進剤の患部への注射に限定される。こうした治療法に代わって、日常的に摂取している食品の中で血管新生促進作用を持つ素材の開発が望まれている。本研究では、食経験が豊富なきのこからこの血管新生促進作用を見出すことを目的とし、ヒト臍帯静脈内皮細胞（以下、HUVEC)を用いて各種試験を行った。
【方法】
9 種類の食用きのこから調製した熱水およびエタノール抽出物を用いて、HUVEC の管腔様形成を指標として血管新生促進作用を持つきのこをスクリーニングした。さらに促進活性が見られた抽出物を酢酸エチルと水で液液分配し、得られた酢酸エチル可溶物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分画し、カラム分画物を調製した。カラム分画物を HUVEC に処理し、HUVEC の管腔様形成能、細胞増殖能および細胞遊走能を測定した。
【結果】
きのこの熱水およびエタノール抽出物の HUVEC に対する管腔様形成促進作用を検証した結果、マイタケのエタノール抽出物のみ管腔様形成促進作用を示した。マイタケエタノール抽出物をさらに分画したところ、マイタケカラム分画物は管腔様形成促進活性を増強し、さらに HUVEC の細胞増殖ならびに細胞遊走を促進した。
【考察】
HUVEC を用いた実験系により、マイタケカラム分画物が血管新生を促進することが示された。そのメカニズムとして、HUVEC の増殖や遊走を促進することが考えられた。以上より、マイタケは虚血性疾患の治療および予防や創傷治癒に対する有効な食材であると考えられた。

Angiogenesis, *Grifola frondosa*, HUVEC

発表責任者：清水　崇光（takamitsu.shimizu@tohoku.ac.jp）

講演番号：2A07a10
講演日時：3 月 18 日 11:45～ A 校舎 07 会場

# 血管内皮細胞におけるガス状シグナル物質硫化水素の特異的検出法の開発

# Detection of hydrogen sulfide in endothelial cells by using monobromobimane

○寺田 智子[1]、宮崎 均[2]、吉田 滋樹[2]([1]筑波大院・生命環境、[2]筑波大・生命環境系)
○Tomoko TERADA[1], Hitoshi MIYAZAKI[2], Shigeki YOSHIDA[2] ([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

【背景および目的】 硫化水素は一般に腐卵臭を持つ毒性の強いガスとして知られているが、近年、一酸化窒素や一酸化炭素に続く第三の体内ガス状シグナル分子として重要視されている。硫化水素は体内でシスタチオニンβ合成酵素、シスタチオニンγリアーゼ（CSE)、3-メルカプトピルビン酸スルホトランスフェラーゼの働きで L-システインなどから合成され細胞保護作用、血管拡張作用等を示すことがこれまでに報告されている。しかし、これらの機能の分子レベルでの解明、他の生理活性物質との相互作用などの研究は未だ十分に進んでいない。これは、硫化水素が酸素濃度、生理的 pH、光などに不安定であり、生体内濃度が非常に低く検出が困難であることが一因である。そこで本研究では、生理活性物質が及ぼす硫化水素生成の制御機構を解明するために、チオール特異的蛍光標識剤と HPLC を用いて、ブタ胸部大動脈血管内皮細胞（EC）における硫化水素の生成を検出する方法を確立することを目的とした。

【方法】硫化水素の検出は、チオール基特異的蛍光標識剤であるモノブロモビマン(MBB)を用いて行った。硫化水素 1 分子に対し、ビマン 2 分子が特異的に結合した硫化ビマン(SDB)の標準品を、$Na_2S$ と MBB から合成し結晶を得た。同 SDB の結晶を逆相 HPLC 分析に供して蛍光検出し SDB の検量線を作成した。次に、各濃度の $Na_2S$ をドナーとして MBB と反応し、ドナー量と生成する SDB 量との相関性を同様の HPLC 分析により検討し、チオール基のドナー量としての検出限界濃度を求めた。さらに、この方法を用いてブタ胸部大動脈血管内皮細胞（EC）からの硫化水素の検出を行った。EC を 10 %FBS を含む DMEM 培地で培養後、1% FBS を含む同培地で同調培養した後、CSE 発現量を高めるヒドロキシチロソル（HT）を添加し培養した。培養後 EC を回収してホモジナイズした後、細胞破砕液に硫化水素合成酵素の基質であるシステインを添加して試験管内で $H_2S$ の生成反応を行った。反応後、MBB を添加し SDB として HPLC 分析を行うことによって $H_2S$ 量を測定した。

【結果および考察】合成した SDB 標準品を HPLC 分析に供した結果、30 μM ～ 600 μM の範囲で直線性が得られた。また、チオール基のドナーとして $Na_2S$ を用いた場合、濃度依存的に SDB のピークを検出可能であった。この方法を EC 中の $H_2S$ 検出に適応し、CSE 発現量を高めるヒドロキシチロソル (HT) の添加の有無による影響を検討した結果、HT 無添加のものに比べて培地中に終濃度 50 μM 添加した場合、HPLC クロマトグラム上での SDB のピークが明らかに増大した。

hydrogen sulfide, monobromobimane, endothelial cells

講演番号：2A07p01
講演日時：3 月 18 日 14:00～ A 校舎 07 会場

# プラズマローゲン分解物や関連化合物の定量法確立と臨床サンプル測定

# Accurate quantitation of ether-phospholipid: Application to clinical samples

○乙木 百合香[1]、加藤 俊治[1]、マリー ヘネベル[2]、アミーヤ タハ[2]、ウォルター スワドフィガー[3]、宮澤 陽夫[4,5]、仲川 清隆[1]([1]東北大院農・機能分子解析、[2]カリフォルニア大学・デーヴィス校、[3]トロント大学、[4]東北大・未来科学技術共同研究センター、[5]東北大院農・食の健康科学ユニット)

○Yurika Otoki[1], Shunji Kato[1], Hennebelle Marie[2], Taha Ameer[2], Swardfager Walter[3], Teruo Miyazawa[4,5], Kiyotaka Nakagawa[1] ([1]Food and Biodynamic Chemistry Laboratory, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, [2]Department of Food Science and Technology, University of California, Davis, [3]Department of Pharmacology and Technology, University of Toronto, Canada, [4]New Industry Creation Hatchery Center (NICHe), Tohoku University, [5]Food and Health Science Research Unit, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University)

【目的】プラズマローゲン（Pls）は、*sn*-1 に特徴的なビニルエーテル結合を有するグリセロリン脂質（PL）の一つである。アルツハイマー病などの中枢神経系疾患者の脳や血中で Pls の減少が報告され、Pls の中枢神経系での機能に注目が集まっている。こうした背景から Pls の精確な定量に興味が持たれ、最近我々は、アルカリ金属を用いた液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析（LC-MS/MS）による Pls の高感度・高選択的分析法を構築した[1,2]。本法により、特定の中枢神経系疾患において、DHA 型 Pls の減少を認めつつある。こうした Pls の減少の理由として、ビニルエーテル結合の酸化分解による Lyso Acyl-PL の生成、ホスホリパーゼによる Lyso Acyl-PL や Lyso Alkenyl-PL の生成、および Pls 合成系の低下（前駆体 Lyso Alkyl-PL や Alkyl-PL の低下）などが考えられる。従来、Lyso Alkenyl-PL、Lyso Alkyl-PL、Lyso Acyl-PL、Alkyl-PL の精密な定量法は構築されておらず、本研究ではアルカリ金属を用いた LC-MS/MS により、こうした Pls 分解物や関連化合物の定量法の確立を目指した。

【方法と結果】Lyso Alkenyl-PL、Lyso Alkyl-PL、Lyso Acyl-PL、Alkyl-PL の標品は Avanti Polar Lipid より購入した。これらの標品をナトリウムイオン存在下で MS/MS 分析したところ、それぞれの構造に特異的なプロダクトイオンが検出された。そこで、これらのプロダクトイオンを用いて LC-MS/MS Multiple Reaction Monitoring (MRM)にて各標品を分析したところ、高感度（fmol レベル）な分析が可能であることがわかった。次いで、メタノールを用いた抽出法を構築し、ヒト血漿からの高収率な抽出を可能とした。本条件下では、Matrix 効果は回避できており、精密かつ安定した定量が可能となった。現在本法を用いて、中枢神経系疾患の臨床サンプルを分析中である。

1) Y. Otoki *et.al. J. Chromatogr. B*. 1004 (2015) 85-92.
2) Y. Otoki *et.al. J. Pharm. Biomed. Analysis*. 134 (2016) 77-85.

plasmalogen, LC-MS/MS, Neurological disease

発表責任者：乙木百合香（y.otoki2@g-mail.tohoku-university.jp）

講演番号：2A07p02
講演日時：3 月 18 日 14:15～ A 校舎 07 会場

# エタノールアミン型プラズマローゲンの吸収評価： とくにコリン型への変換について

# Absorption of ethanolamine plasmalogen: its conversion to choline form

○上吉原 怜奈[1]、乙木 百合香[1]、伊藤 隼哉[1]、加藤 俊治[1]、山下 慎司[2]、池田 郁男[3]、宮澤 陽夫[4,5]、仲川 清隆[1] ([1]東北大院農・機能分子解析、[2]帯広畜産大・機能科学、[3]東北大院農・食品化学、[4]東北大・未来科学技術共同研究センター、[5]東北大院農・食の健康科学ユニット)

○Reina KAMIYOSHIHARA[1], Yurika OTOKI[1], Jyunya ITO[1], Syunji KATO[1], Shinji YAMASHITA[2], Ikuo IKEDA[3], Teruo MIYAZAWA[4,5], Kiyotaka NAKAGAWA[1] ([1]Food and Biodynamic Chemistry Laboratory, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University., [2]Department of Food Science Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine., [3]Laboratory of Food and Biomolecular Science, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University., [4]New Industry Creation Hatchery Center (NICHe), Tohoku University., [5]Food and Health Science Research Unit, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University.)

【目的】プラズマローゲン（Pls）は、*sn*-1 位にビニルエーテル結合を有するリン脂質の一つで、主にエタノールアミン型プラズマローゲン（PE-Pls）やコリン型プラズマローゲン（PC-Pls）がある。PE-Pls の機能性が報告されるにつれ、その吸収代謝の研究も行われはじめ、PE-Pls をラットなどの実験動物に与えると、その一部が、吸収の過程（および体内）で、PC-Pls に変換されることが示唆されている[1]。この更なる証明に向けては、PC-Pls を選択的に分析できる方法が有用と考えられる。最近、我々は、HPLC-MS/MS 分析時にアルカリ金属を用いると、PC-Pls（および PE-Pls）のビニルエーテル結合から特徴的なプロダクトイオンが生じることを見出し[2]、これら Pls を高選択的に定量できる方法を開発した[3]。そこで本研究では、ラットを用いて胸管リンパカニュレーション試験を行い、吸収過程における PE-Pls から PC-Pls への変換について、アルカリ金属を用いた HPLC-MS/MS 法で評価した。

【【方法と結果】カキから PE-Pls を抽出し、カラム分画して、PE-Pls 濃縮物を得た。この濃縮物は PE-Pls 18:0/18:1, 18:0/20:4, 18:0/22:6 を約 20%含み、PC-Pls は検出限界以下であることを、HPLC-MS/MS 分析により確認した。この PE-Pls 濃縮物に、タウロコール酸ナトリウムとアルブミンを含む水溶液を加え、超音波処理し、エマルジョンを調製した。このエマルジョン（PE-Pls 18:0/18:1, 18:0/20:4, 18:0/22:6 を合計 5 mg 含む）を、胃に挿入したチューブを介してラットに投与し、胸管に挿入したチューブから経時的にリンパ液を回収した（n=2）。得られたリンパ液を HPLC-MS/MS 分析した結果、投与 30 分後には確かに PE-Pls 18:0/18:1, 18:0/20:4, 18:0/22:6 が、幾分遅れて、投与したエマルジョンには含まれていない PC-Pls 18:0/18:1, 18:0/20:4, 18:0/22:6 がそれぞれリンパ液から検出されることがわかった。したがって、吸収の過程での PE-Pls から PC-Pls への変換は明白と考えられる。興味深いことに、投与したエマルジョンには PE-Pls 18:0/18:1, 18:0/20:4 に比べて PE-Pls 18:0/22:6 が多く含まれるにもかかわらず、リンパからは PE-Pls 18:0/20:4（および PC-Pls 18:0/20:4）が顕著に検出された。したがって、吸収過程での再エステル化の可能性が示唆された。この再エステル化の可能性や、投与したカキ PE-Pls には今回測定した 18:0/18:1, 18:0/20:4, 18:0/22:6 以外の分子種も含まれるため、一概に PE-Pls の吸収率を計算できないが、吸収率は数%と予想された。

【参考文献】[1] M. Nishimukai, M .Yamashita, Y. Watanabe, Y. Yamazaki, T. Nezu, R. Maeba, H. Hara, Lymphatic absorption of choline plasmalogen is much higher than that of ethanolamine plasmalogen in rats. Eur. J. Nutr., 50, 427-436 (2011)

[2] Y. Otoki, K. Nakagawa, S. Kato, T. Miyazawa, MS/MS and LC-MS/MS analysis of choline/ethanolamine plasmalogens via promotion of alkali metal adduct formation. J. chromatogr. B, 1004, 85-92 (2015)

[3] Y. Otoki, S. Kato, F. Kimura, K. Furukawa, S. Yamashita, H. Arai, T. Miyazawa, K. Nakagawa, Accurate quantitation of choline and ethanolamine plasmalogen molecular species in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Pharm. Biomed. Anal., 134, 77-85 (2016)

Plasmalogen, Absorption, Mass spectrometry

講演番号：2A07p03
講演日時：3 月 18 日 14:30～ A 校舎 07 会場

ルテオリンの吸収動態と生理作用の評価
Evaluation of metabolic fate and bioactivity of luteolin
○早坂 夏実[1]、呉 綾子[1]、加藤 俊治[1]、毛利 哲[2]、津志田 藤二郎[2]、宮澤 陽夫[3,4]、仲川 清隆[1] ([1]東北大院農・機能分子解析学、[2]宮城大食産業、[3]東北大・未来科学技術共同研究センター、[4]東北大院農・食の健康科学ユニット)
○Natsumi HAYASAKA[1], Ayako KURE[1], Shunji KATO[1], Satoshi MOURI[2], Tojiro TSUSHIDA[2], Teruo MIYAZAWA[3,4], Kiyotaka NAKAGAWA[1] ([1]Food and Biodynamic Chemistry Laboratory, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, [2]Department of Food Management, School of Food, Agricultural and Environmental Sciences, Miyagi University, [3]New Industry Creation Hatchery Center (NICHe), Tohoku University, [4]Food and Health Science Research Unit, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University)

**【背景・目的】**ルテオリンは、パプリカの葉やシソなどに含まれるフラボノイドの一種で、抗アレルギーや抗酸化、抗ガンなどの生理作用が報告されている。しかし、ヒトや動物がルテオリンを摂取しても、活性体と示唆されるルテオリン（アグリコン; 遊離体）の大部分は、体内で速やかにグルクロニドなどの抱合体に代謝されると言われ、故に、アグリコンあるいは抱合体のいずれが活性物質であるかは未だ不明な点が多い。そこで本研究では、（1）*in vivo* 試験でルテオリンのアグリコンや種々の配糖体（ルテオリン-7-グルコシドやルテオリン-7-アピオシルマロニルグルコシド、ルテオリン-7-アピオシルグルコシド）をラットへ経口投与し、血漿や臓器におけるルテオリンの存在形態を知ろうとした。さらに、（2）その生理活性を *in vitro* 試験で評価して、ルテオリンの生理機能発現メカニズムを明らかにしようとした。
**【方法・結果】**（1）SD 系ラット（8 週齢, 雄性）にルテオリンアグリコン（20 mg/kg ラット）、あるいは配糖体（ルテオリン-7-グルコシド; 20 mg/kg ラット）を投与し、0～24 時間後に採血した。LC-MS/MS 分析した結果、アグリコンと配糖体のいずれの投与においても、血漿にはグルクロニド、とくにルテオリンの 3’位にグルクロン酸が一つ結合したルテオリンモノグルクロニドが多いことがわかった。他には、ルテオリンジグルクロニド、ルテオリングルクロニドサルフェートも存在した。ルテオリンモノグルクロニドの血中濃度は、投与 3～6 時間後に高値となり、その後に減少して 24 時間後には検出限界以下となった。6 時間後に解剖し、小腸、肝臓、腎臓を LC-MS/MS 分析したところ、これらの臓器にもルテオリンモノグルクロニド（グルクロン酸の結合部位は 3’、4’、あるいは 7 位）が多かった。現在は、他の配糖体（ルテオリン-7-アピオシルマロニルグルコシドおよびルテオリン-7-アピオシルグルコシド）の吸収代謝、さらにはヒトでの吸収動態を調べている。（2）上記実験でラットの血液および臓器に多く存在した 3 種のルテオリンモノグルクロニド（ルテオリン-3’-グルクロニド,ルテオリン-4’-グルクロニド,ルテオリン-7-グルクロニド）に着目し、これらを有機合成などで調製した。次いで、LPS 刺激した RAW264.7 細胞に処理した。DNA マイクロアレイ解析と PCR 試験の結果、これらの抱合体（とくにルテオリン-7-グルクロニド）に抗炎症作用が観察された。この作用は、アグリコンよりは弱かったものの、本結果から、体内に主として存在する抱合体（ルテオリンモノグルクロニド）は活性を維持していると示唆された。以上より、ルテオリンの生理機能発現メカニズムの解明に資する知見が得られたと考えられる。

luteolin, metabolic fate, anti-inflammatory

講演番号：2A07p04
講演日時：3 月 18 日 14:45～ A 校舎 07 会場

外因性酸化コレステロールの体内動態の解析
In vivo kinetic of exogenous oxidised cholesterol in rats
○加藤 慧士、中堀 紘花、長田 恭一 (明治大農)
○Satoshi Kato, Hiroka Nakahori, Kyoichi Osada (Meiji Univ.)

【目的】
食品中のコレステロールは、加熱などの加工や長期間の保存により酸化され、酸化コレステロール（OXC）を生じる。摂取した OXC は生体内に徐々に蓄積され、動脈硬化性疾患、アルツハイマー病、癌、あるいは骨粗鬆症といった種々の疾患発症に寄与する可能性が指摘されている。我々は以前、OXC を経口投与したところ、24 時間を経過しても生体内に残存することを確認した。そこで本研究では、OXC をラットに経口投与し、7 日間の経日的な OXC の生体内動態ならびにクリアランス機構について検討した。

【方法】
6 週齢の Wistar 系雄ラットを 12 時間絶食させた後、OXC を 50mg 含むエマルションを胃内に強制投与した。0、1、2、3、7 日後に解剖を行い、脳、血液、動脈、心臓、肝臓、腎臓、大腿骨、白色脂肪、胃、小腸、盲腸、大腸、尿および糞便を採取した。血漿は超遠心分離により、VLDL、LDL および HDL 画分に分画した。採取した各組織とリポタンパク質画分から脂質を抽出後、GC-MS を用いて OXC を測定した。

【結果・考察】
投与後 1 日目には、肝臓での OXC 濃度が大きく増大した。特に β 型の水酸基や、ケト基を有した OXC の増大が確認された。一方、血漿中の OXC 濃度は 1 日目にはほとんど増大せず、そのレベルは肝臓と比べて 1/2 以下であった。投与後 2 日目以降は、肝臓の OXC 濃度が徐々に低下し 3 日目にはほぼ蓄積は認められなくなった。一方、血漿の OXC 濃度は経日的に増加する傾向を認めた。これらのことから、摂取した OXC は肝臓に取り込まれた後、3 日以内に末梢組織へ運搬されたり、排泄されたりすること、また、LDL や VLDL 等のリポタンパク質に組み込まれて、血漿中を循環する可能性が考えられた。また、大腿骨中の OXC 濃度を測定したところ、投与後 1 日目で、7 位に水酸基やケト基を有した OXC の濃度が増大し、2 日目以後に徐々に低下する傾向も認められた。よって、摂取した OXC の一部は骨組織にも移行するものと考えられた。現在、その他の組織についても解析を進め、経日的な OXC の生体内動態ならびにクリアランス機構について検討している。

oxysterol, cholesterol, kinetic

講演番号：2A07p05
講演日時：3 月 18 日 15:00～ A 校舎 07 会場

# 低分子プロシアニジンを含む Oligonol の体内動態の解析

# In vivo kinetic analysis of Oligonol containing low molecular procyanidins in rats

○依田 浩樹、河合 咲紀、林 洪太、長田 恭一 (明治大農)
○Hiroki Yoda, Saki Kawai, Kouta Hayashi, Kyoichi Osada (Meiji Univ.)

【目的】カテキンの重合体であるプロシアニジンは種々の生理活性を示すことが知られている。しかし、分子量が大きいことに加え、構造が多様であることから、摂取後の生体内での動態は詳しく明らかにされていない。体内での動態を明らかにすることができれば、生理活性の発現メカニズムや安全性をより理解しやすくなると考えられる。本研究では、ラットを用いてプロシアニジン類の体内動態を明らかにすることを目的とした。

【方法】5 週齢の雄性 Wistar 系ラットを MF 標準固形飼料で 15 日間飼育した後に低分子化ライチポリフェノールおよび緑茶抽出物の混合物である Oligonol を生理食塩水に溶解し、1000 mg/kg B.W.のレベルで胃内に強制投与し、投与から 0, 1, 2, 6 時間後に解剖して血漿、肝臓、腎臓、尿を採取した。採取した試料中のプロシアニジン代謝産物について LC-ESI-MS に供して分析を行った。また、分析条件を至適化するために様々な条件においてプロシアニジン添加回収試験を行った。

【結果】分析をする全ての試料について添加回収試験を行ったところ、尿では高い回収率となったが、血漿、肝臓および腎臓では回収率は低くなった。Oligonol の経口投与を行ったラットの血漿からはエピカテキンのグルクロン酸抱合体、メチル化体、硫酸抱合体等の代謝産物が検出され、その濃度は投与から 1 時間後に最大となった。また、尿では血漿から検出された抱合体およびそれらの構造異性体に加え、エピガロカテキンのグルクロン酸抱合体やメチル化体も検出された。プロシアニジンに関しては、A 型の二量体が投与 1 時間後において血漿および腎臓から検出され、腎臓からはメチル化体も検出された。

【考察】本研究では二量体以上のプロシアニジン類は大半の試料から検出されなかったが、投与 1 時間後に解剖したラットの 1 検体からは A 型プロシアニジン二量体が検出された。このことから吸収された A 型プロシアニジン二量体の大半は 1 時間以内に排泄されている可能性が考えられた。また、以前の研究で B 型プロシアニジン二量体はグルクロン酸抱合を受けることを明らかにしたが、本研究では A 型プロシアニジン二量体の抱合体は主にメチル化体のみであった。よって、プロシアニジンはその構造により抱合化反応に違いが生じるのではないかと予想された。

Procyanidin, LC-MS, rat

講演番号：2A07p06
講演日時：3 月 18 日 15:25～ A 校舎 07 会場

# 黒大豆種皮抽出物の血管内皮機能改善作用

# The effects of black soybean seed coat extract on endotherial function.

○難波 文男[1]、齋藤 静[1]、戸田 登志也[1]、山下 陽子[2]、芦田 均[2]([1]フジッコ株式会社、[2]神戸大学大学院　農学研究科)
○Fumio NAMBA[1], Shizuka SAITO[1], Toshiya TODA[1], Yoko YAMASHITA[2], Hitoshi ASHIDA[2]
([1]FUJICCO Co., Ltd., [2]Graduate School of Agricultural Science of Kobe University)

【背景と目的】黒大豆は様々な効能を有すると言われており、多くの漢方書には活血（血流改善）効果が記載されている。我々は黒大豆の様々な効果に着目し、特に黒大豆種皮抽出物（BE）について研究を行なってきた。BE はプロシアニジンをはじめとするポリフェノール類を豊富に含み、非常に高い抗酸化作用を示す。また我々はこれまでに、BE による血管内皮細胞の NO 産生促進作用、Tie2 活性化作用等を明らかにしてきた。今回は加速度脈波計を用いてヒトの血管内皮機能に対する BE の作用について検討した。【方法】健常な男女 24 名（男性 17 名、女性 7 名、平均年齢：49.7±9.5 歳）を対象に、単盲検クロスオーバーの投与試験を行なった。被験者の条件として、事前に行なったスクリーニング検査において、加速度脈波計（TAS9VIEW、㈱YKC 製）により計測される血管年齢が実年齢以上である者を選抜した。また、血圧または血流に関連する医薬品を服用している者は除外した。試験食としては BE100mg 含有カプセル、プラセボ食としてはデキストリン含有カプセルを用い、1 粒/日、摂取期間 2 週間（ウォッシュアウト期間は 2 週間）とした。摂取の条件としては、就寝直前に水とともに摂取させた。摂取開始前、摂取 1 週間目および摂取 2 週間目に検査を行ない、加速度脈波、血圧（HEM-1010、オムロンヘルスケア㈱製）を測定した。また、検査日の第一尿を採取し、尿中 NO 代謝産物の濃度および過酸化脂質（TBARS）濃度の測定に供した。【結果】加速度脈波の測定結果から、BE の摂取により、2 週目において動脈血管弾性度、血管年齢、血管健康度、残血量がプラセボ摂取群と比較して有意に改善した。さらに、尿中の NO については、1 週目および 2 週目において BE 摂取群で摂取前と比較し有意に増加したが、プラセボ摂取群では試験期間を通じて変化しなかった。このことから、BE による血管への作用は、血管内皮細胞の NO 産生能が影響している可能性が示唆された。また、尿中 TBARS については、BE 摂取群でプラセボ摂取群と比較して 1 週目および 2 週目において有意な低値を示した。一方、プラセボ摂取群の尿中 TBARS は試験期間を通じて変化は認められず、BE の経口摂取によって酸化ストレスが低下することが示唆された。血圧については、BE の摂取により臨床的に意味のある変化は認められなかった。これらの結果から、BE はヒト体内において抗酸化作用を示し、血管内皮機能を改善することが示唆された。

black soybean, endotherial function, polyphenols

発表責任者：難波　文男（f-nanba@fujicco.co.jp）

講演番号：2A07p07
講演日時：3 月 18 日 15:40～ A 校舎 07 会場

# 黒大豆の加工によるポリフェノール含量と機能性の変化

# Changes in the polyphenol content and biological functions of black soybeans after processing process

○仲村 明日賀[1]、王 柳青[1]、難波 文男[2]、戸田 登志也[2]、芦田 均[1]、山下 陽子[1]([1]神大農、[2]フジッコ株式会社)
○Asuka NAKAMURA[1], Liuqing WANG[1], Fumio NAMBA[2], Toshiya TODA[2], Hitoshi ASHIDA[1], Yoko YAMASHITA[1] ([1]Kobe Univ., [2]FUJICCO. Co., Ltd.)

【目的】黒大豆種皮には、シアニジン-3-グリコシドやエピカテキン、プロシアニジンなどのポリフェノールが豊富に含まれ、様々な生理機能があることが知られている。しかしながら、実際にヒトが食する場合には調理加工工程を経るため、これらの成分が損失あるいは構造の変化を起こすと想定される。しかし、黒大豆を調理加工した後のポリフェノール含量やその機能性、体内動態などは明らかになっていない。そこで本研究では、黒大豆加工品に関する機能性と、その体内動態を調べることを目的とした。
【方法】黒大豆加工品は、原穀黒大豆種皮(原穀黒)、煎り黒大豆種皮（煎り)、水煮黒大豆種皮（水煮)、黒大豆煮汁（煮汁）の 4 つを用いた。対照として、原穀黄大豆種皮（原穀黄）を用いた。原穀黒と煎りは、種皮を剥ぎ取り乾燥後、ミルで粉砕した。水煮は 80℃の水に硫化鉄、炭酸水素ナトリウム、塩化ナトリウムを添加し 3 時間加熱した。加熱後の種皮を剥ぎ取り、凍結乾燥させてミルで粉砕したものを水煮、残りの煮汁を減圧濃縮後、凍結乾燥させミルで粉砕したものを煮汁とした。これらの粉末サンプルは 0.5%酢酸含有 70%アセトンでポリフェノールを抽出し、HPLC に供してポリフェノール含量を測定した。また各粉末サンプルを ICR マウスに、2％の混餌下で一週間自由摂取させた。飼育終了時の体重、組織重量、血液マーカーを測定するとともに、血漿中のポリフェノール濃度を測定した。
【結果】粉末サンプル中のポリフェノール含量は、原穀黒が他のサンプルに比べて著しく大きく、続いて煎り＞水煮＞煮汁の順になった。原穀黄にはほとんど含まれていなかった。動物実験において、総白色脂肪重量と体重に各群間で有意な差は認められなかったものの、皮下脂肪重量が煎り群で原穀黄群と比較して有意に低値を示した。また、血中コレステロール濃度は、原穀黒、煎り、水煮、煮汁群でコントロール群と比較して有意に低値となった。血糖値も、煎り群でコントロール群と比較して有意に低値となった。以上の結果から、煎りの脂肪蓄積ならびに血糖調節能が他の加工品に比べて高いことが示唆された。血漿中のポリフェノール濃度は、いずれのサンプルにおいてもエピカテキン抱合体が認められた。原穀黄以外の 4 つのサンプルでは、エピカテキン抱合体に比べて血漿中濃度が低いものの、プロシアニジン B2 抱合体も検出された。
【結論】黒大豆は、加工過程によりポリフェノール含量が減少するが、煎り黒大豆では種皮のポリフェノール含量が比較的高く、機能性も高いことが判った。

black soybeans, polyphenol, biological function

発表責任者：仲村明日賀（asukarirarira@gmail.com）

講演番号：2A07p08
講演日時：3 月 18 日 15:55～ A 校舎 07 会場

# 黒大豆の生体機能性について

Biological function of black soybean.

○山下 陽子[1]、難波 文男[2]、齋藤 静[2]、戸田 登志也[2]、芦田 均[1] ([1]神大院農、[2]フジッコ株式会社)
○Yoko YAMASHITA[1], Fumio NAMBA[2], Shizuka SAITO[2], Toshiya TODA[2], Hitoshi ASHIDA[1] ([1]Kobe Univ, [2]FUJICCO Co., Ltd.)

【背景と目的】黒大豆は種皮にポリフェノールを多く含み、実には良質のペプチド類やミネラル、食物繊維やイソフラボンなどの成分を含む栄養豊富な食材であり、様々な生体機能を有することが知られている。本研究では、黒大豆の生体機能性とその作用機構解明を試みた。まず、黒大豆種皮ポリフェノールの機能性として、①黒大豆種皮抽出物(BE)を用い、高脂肪食摂取によって惹起される肥満に対する予防効果とその作用機構について検討した。また、黒大豆の機能性として、②ヒトに煎り黒大豆を摂取させた際の血管内皮機能におよぼす効果について検討した。【方法】①実験動物を用いて食事誘導性肥満モデルマウスに、BE をそれぞれ 0, 0.2, 2%添加した飼料を作製し、14 週間自由摂取させた。飼育終了時には脂肪組織重量、血漿中グルコースおよびインスリン濃度、アディポネクチンを測定した。また、脂肪組織における脂質代謝関連因子と炎症性サイトカインの発現を検討した。②ヒト試験では、健常な女性 47 名を対象にオープン前後比較試験を行った。試験食に用いる黒大豆の調理法は、予備試験において、黒大豆種皮ポリフェノールが最も高濃度で含有していた煎り黒大豆を採用した。試験食は煎り黒大豆 30 g/日を 8 週間摂取させた。摂取するタイミングは自由摂取とした。摂取開始前、摂取 4 週間目および 8 週間目に検査を行ない、体組成、加速度脈波、血圧（HEM-1010、オムロンヘルスケア㈱製）を測定した。また、検査日の第一尿を採取し、血管拡張に関わる尿中 NO 濃度の測定に供した。絶食下での採血も行い、一般生化学検査に供した。【結果】①動物実験では、BE が高脂肪食摂取による体重増加および白色脂肪の蓄積を抑制し、血漿グルコースおよびインスリン濃度を低下させた。その作用機構としては、エネルギー産生に関わる UCP の発現を増加させることと、腸間膜脂肪組織における炎症性サイトカインの発現を抑制することが考えられた。②ヒト試験において、加速度脈波の測定結果から、煎り黒大豆の摂取により、拍出強度、動脈血管弾性度、血管波形、波形点数、血管年齢、動脈年齢、血管健康度、残血量が摂取前と比較して有意に改善した。血圧については、煎り黒大豆の摂取により低下した。さらに、尿中の NO は、摂取煎り黒大豆の摂取により摂取前と比較し有意に増加した。【考察】これらの結果から、黒大豆は代謝促進効果を持ち、マウスでは肥満抑制効果を、ヒト体内では血管内皮機能改善効果を有することが示唆された。

本研究の一部は、平成 28 年度農林水産省機能性農産物等の食による健康都市づくり支援事業および SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）における「次世代農林水産業創造技術」のにより実施した。

Black soybean, endotherial function, anti obesity

発表責任者：山下　陽子（yoko.y@crystal.kobe-u.ac.jp）

講演番号：2A07p09
講演日時：3 月 18 日 16:10～ A 校舎 07 会場

# ニンニク成分アリシンはカプサイシン受容体 TRPA1 を介してラット大腸起電性クロライドイオン分泌を亢進する

# Allicin induces electrogenic chloride secretion in the rat colon via the capsaicin receptor TRPA1

○土谷 庸[1]、川俣 幸一[2] ([1]東北女子大健康栄養、[2]東北生活文化家政)
○Yo Tsuchiya[1], Koichi Kawamata[2] ([1]Tohoku Women's College, [2]Tohoku Seikatsu Bunka Univ.)

【序論】

ニンニクの香り成分であるアリシンには、疲労回復、癌細胞成長抑制、殺菌効果、整腸作用など様々な生理的効果があることが報告されている。本実験ではアリシンの整腸作用効果に着目した。これまでアリシンによる腸管蠕動運動調節作用は報告されているが、腸管イオン輸送や水輸送制御に対する効果は不明であった。本研究ではアリシンのイオン輸送制御メカニズムを解明するため、カロメル電極を用いた腸管膜電位差測定法を用いてアリシンが起電性イオン輸送に及ぼす効果を検討した。

【方法】

ラット大腸を約 5cm 切除したのち、大腸筋層および漿膜をピンセットで剥離し、大腸粘膜層のみから成る標本を作製した。腸管膜電位差測定のためウッシングチャンバーに粘膜標本を固定し、KCl 寒天電極を腸管標本の粘膜側と血管側にセットし、カロメル電極を通じて高感度 DC 記録計に接続して記録した。

【結果および考察】

大腸粘膜標本の基底膜側にアリシン 30μM を投与した場合、腸管膜電位の正側への上昇がみられた。この結果は、アリシンが大腸粘膜細胞の基底膜側に存在する受容体に直接結合して陽イオン吸収もしくは陰イオン分泌亢進を起こしたことを示唆している。アリシン投与における電位変化は、上皮性 Na チャネル ENaC 阻害剤であるアミロライドを頂端膜側に前投与した場合と非投与時を比較しても有意差は見られなかった。一方、クロライドイオン輸送体である Na-K-2Cl 共輸送体の阻害剤ブメタニドを基底膜側に前投与した場合、電位変化はブメタニド非投与時に比べ約 60%有意に低下した。またアリシン誘導電位変化はカプサイシン受容体 TRPA1 阻害剤である AP18 前投与により有意に抑制されたが、同受容体 TRPV1 阻害剤であるカプサゼピン前投与の場合は抑制が見られなかった。以上の結果から、アリシンは大腸粘膜基底膜側に存在する TRPA1 を介して Na-K-2Cl 共輸送体経由の起電性クロライド分泌を亢進することが示唆された。

allicin, colon, chloride secretion

講演番号：2A07p10
講演日時：3 月 18 日 16:25～ A 校舎 07 会場

ジアシルグリセロールキナーゼ α 活性化剤としての緑茶カテキン EGCg の経口投与による糖尿病性腎症改善効果
The effect of oral administration of green tea polyphenol-EGCg as an activator of diacylglycerol kinase α on diabetic nephropathy
○林 大輝、上田 修司、山之上 稔、芦田 均、白井 康仁（神戸大院・農・生命機能）
○Daiki HAYASHI, Shuji UEDA, Minoru YAMANOUE, Hitoshi ASHIDA, Yasuhito SHIRAI (Graduate School of Agricultural Science, Kobe Univ.)

【目的と背景】 糖尿病性腎症(DN)は糖尿病の血管合併症のひとつであり、その発症及び増悪の一因として、高血糖により産生されるジアシルグリセロール(DG)によるプロテインキナーゼ C(PKC)の異常な活性化が知られている。一方、DG キナーゼ(DGK)は DG をホスファチジン酸に変換する酵素であることから、PKC 活性を間接的に抑制し、DN を改善することが期待される。現在までに、ビタミン E(VtE)がラット腎糸球体において DGK の活性化を介し、PKC 活性を正常化することにより DN を改善することが報告されている。さらに我々は、この VtE による DN 改善には、腎糸球体に存在する DGK サブタイプの中でも特に、DGKαが重要な働きをしていることを DGKα欠損マウスを用いた実験により明らかにした。一方我々は、緑茶に含まれるエピガロカテキンガレート(EGCg)が、67LR を介して DGKαを活性化することも報告している。そこで、本研究では DGKαの活性化剤であることが明らかになった EGCg が DN 改善に寄与するのか否かを検証した。
【方法】 生後 6 週齢の雄性野生型 C57BL/6 マウスをストレプトゾトシン(STZ)投与により糖尿病にし、1 %EGCg を含む粉末飼料を与える群と通常の粉末飼料を与える群に分け、DN の指標である尿量、尿アルブミン量を STZ 投与後 1 週間おきに 6 週目まで測定し、比較した。
【結果】 STZ 投与後 1 週目において STZ を投与した群で血糖値の上昇を確認することができた。1 %EGCg を投与した群では、血糖値の改善傾向は認められなかったものの、DN の指標である尿量及び尿アルブミン量の値が通常飼料群と比較して有意に改善した。即ち、EGCg の経口投与が DN を改善することが明らかとなった。ついで、EGCg の量を 0.05, 0.1, 0.5 %とし、同様の実験を行った。その結果、0.05 %の EGCg 投与(約 75 mg/kg)によっても DN が有意に改善することが明らかとなった。さらに、EGCg の受容体である 67LR 及び DGKαは共に腎糸球体血管上皮細胞(podocyte)に発現していることから、実験に用いたマウスの腎臓を摘出し、podocyte のマーカー蛋白質である nephrin 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより podocyte の脱落を評価した。その結果、通常飼料群は、DN において腎臓のろ過機能障害をもたらす podocyte の脱落が顕著であったが、1 %EGCg を投与したマウスでは podocyte の脱落が有意に抑制されていることが明らかとなった。これらのことから、EGCg は腎糸球体 podocyte において、その脱落を抑制することにより DN 改善に寄与することが示唆された。現在、DGKα欠損マウスを用いた検討を行うとともに、その詳細なメカニズムについて検証を行っている。

diacylglycerol kinase α, diabetic nephropathy, epigallocatechin-gallate

発表責任者：林 大輝（dfncd901@yahoo.co.jp）

講演番号：2A07p11
講演日時：3 月 18 日 16:50～ A 校舎 07 会場

α-シクロデキストリンで包接されたレンチオニンの安定性とその血小板凝集抑制作用
Stability of lenthionine included in α-cyclodextrin and its inhibitory effect against platelet aggregation
○中条 早紀[1]、島田 正一郎[1]、櫻井 彩夏[2]、関 祐作[2]、赤尾 真[1,2]、熊谷 日登美[1,2]（[1]日大院生資科、[2]日大生資科）
○Saki Nakajo[1], Shoichiro Shimada[1], Ayaka Sakurai[2], Yusaku Seki[2], Makoto Akao[1,2], Hitomi Kumagai[1,2] ([1]Grad Sch. Nihon Univ., [2]Nihon Univ.)

【目的】現在，心疾患や脳血管疾患などの血栓症が基盤となって引き起こされる疾患が問題視されており，日本人の死亡原因の上位を占めている。このような疾患の予防手段として，血小板凝集抑制作用を有する食品の摂取が挙げられており，食品による血栓症の予防や改善が期待されている。我々はこれまでに，シイタケのフレーバー成分であるレンチオニンが，*in vitro* においてヒト多血小板血漿に対して血小板凝集抑制作用を示すこと，および，経口胃内投与した場合でも血小板凝集を抑制することを明らかにしている。さらに，レンチオニンの利用性向上のためα-シクロデキストリン（CD）による包接を試みたところ, レンチオニンはα-CD により 1:2 のモル比で包接が可能であることが示唆されている。しかしながら，包接されたレンチオニンが，未処理のレンチオニンと比べて安定なのか，また，包接されたレンチオニンを経口摂取した場合でも血小板凝集抑制作用を示すか否かは未だ明らかとなっていない。そこで本研究では，α-CD で包接したレンチオニンを室温で保存し，その安定性を検討した。また，包接されたレンチオニンを経口摂取した場合でも血小板凝集抑制作用を示すか否かを明らかとするため，ラットにα-CD で包接されたレンチオニンを経口胃内投与した後，経時的に採血し，*ex vivo* での血小板凝集抑制作用について検討を行った。
【方法】水に溶解したα–CD と DMSO に溶解したレンチオニンを混合し，密閉容器内に入れ，室温で 1 ～ 7 日間保存した。その後，ジクロロメタンでレンチオニンを抽出し，GC/MS により，残存レンチオニン量を測定した。また, 水と DMSO に溶解したレンチオニンを混合し, 同様の実験を行い, α–CD 包接によるレンチオニンの安定性について評価した。さらに，6 週齢雄 Wistar 系ラットにα–CD で包接されたレンチオニンを胃ゾンデにより投与し，経時的に下大静脈採血を行い，得られた多血小板血漿を用いて ADP 惹起による血小板凝集抑制効果を測定した。また，α-CD で包接したレンチオニンをラットに種々の濃度で経口胃内投与し，経時変化の検討実験で最大血小板凝集抑制能を示した時間に採血し，レンチオニンが血小板凝抑制作用を示す最低投与量について検討した。
【結果】未包接のレンチオニンは，7 日間の保存中に濃度が著しく減少したのに対し，α–CD で包接されたレンチオニンは，ほとんど濃度の減少が見られなかった。また，α-CD で包接したレンチオニンは，経口胃内投与 4～8 時間後において，レンチオニン未投与の場合と比較し，有意に血小板凝集を抑制した。さらに，α-CD で包接したレンチオニン 1 mg/kg 以上の投与で，レンチオニン未投与の場合と比較し，有意に血小板凝集を抑制した。

lenthionine, α-cyclodextrin, stability

発表責任者：熊谷日登美（kumagai@brs.nihon-u.ac.jp）

講演番号：2A07p12
講演日時：3 月 18 日 17:05～ A 校舎 07 会場

# 食品由来 ACE 阻害ペプチドの相乗効果と阻害様式

Synergistic effect and inhibitory pattern of food derived ACE inhibitory peptides.

○岩本 しほり、山﨑 遼、小山 正浩、中村 浩蔵 (信州大農)
○Shihori IWAMOTO, Ryo YAMAZAKI, Masahiro KOYAMA, Kozo NAKAMURA (Shinshu Univ.)

【目的】ソバスプラウト乳酸発酵物から単離された降圧ペプチドH-Trp-Thr-Phe-Arg-OH(WTFR)は，*in vitro*アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害能は弱いが，高血圧自然発症ラット(SHR)を用いた*in vivo*試験では胸部大動脈を含む主要循環器系の組織ACE活性を有効に阻害して血圧を低下させた[1]。そこで，組織ACE阻害メカニズムを調べた結果，WTFRは活性フラグメント(WT，TF，FR，WTF，TFR)と共に血管組織へ蓄積し局所的にペプチド濃度が高まるとともに，複数のACE阻害ペプチドが相乗効果を発揮することで，強い生体組織ACE阻害活性を引起すと推測された[2]。しかし，これまで複数のペプチド性ACE阻害剤による相乗効果の詳細なメカニズムについては明らかになっていない。そこで本研究では*in vitro*試験により，相乗効果を引き起こすペプチドの組み合わせを探索し，Lineweaver-Burkプロットにより阻害様式を解析することで，相乗的なACE阻害作用メカニズムについて検討した。
【方法】*in vitro* ACE阻害活性は、堀内らの方法を参考に，酵素としてウサギ肺由来ACEを基質としてHip-His-Leuを用いて試験を行い，ACEにより遊離した馬尿酸の量をHPLCで定量して評価した。相乗効果を評価は、まず，ペプチド単独のACE阻害活性を測定し，50%阻害濃度（$IC_{50}$）を算出した。その後，WTFRおよびフラグメントを25%阻害濃度で2種混合した溶液を調製し，ACE阻害活性を測定した。理論値(50%阻害)と比較して有意に高いACE阻害活性が得られた場合，相乗効果ありと判断した。相乗効果が得られた組み合わせについて， Lineweaver-Burkプロットを作成して阻害様式を確認した。
【結果】ペプチド単独の$IC_{50}$値は，4.8-11.9mMであった。この活性をもとに25%阻害濃度を決定し，2種混合試験を行った。その結果，WTFR-フラグメントのいくつかの組み合わせにおいて理論値から1.3-1.7倍ほど高いACE阻害活性を確認し，組み合わせにより相乗効果が得られることを確認した。そこで，Lineweaver-Burkプロットにより単独および混合物の阻害様式を確認したところ，ペプチド性ACE阻害剤の一般的な阻害様式である拮抗阻害以外の阻害様式も確認された。ACEは，アンジオテンシンII生成にかかわる主要ドメイン以外にもう一つ活性ドメインを持つことが知られており，両方のドメインに結合することで高い阻害効果が得られることが報告されている[3]。つまり，複数のACE阻害ペプチドが同時に両方のドメインに結合することで相乗効果を引き起こしていると考えられた。現在，*in vivo*での相乗効果を確認するために，ペプチド混合物のSHRへの単回経口投与試験を進めている。

[1] Koyama, M. et.al., *J. Agric. Food Chem.*, 61, 3013-3021, **2013.**, [2] Koyama, M. et.al., *PLOS ONE.*, 9, e105802, **2014.**, [3] Corradi, H.R. et.al., *J. Mol. Biol.*, 357, 964-974, **2006.**

antihypertensive peptides, inhibitory pattern, synergisitc effect

発表責任者：中村浩蔵（knakamu@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2A07p13
講演日時：3 月 18 日 17:20～ A 校舎 07 会場

コリンエステル類高含有食品の探索
Search for foods highly containing cholineesters
○山口 翔平、松本 健督、森田 恵梨、三輪 優莉絵、小山 正浩、中村 浩蔵（信州大農）
○Shohei YAMAGUCHI, Kento MATSUMOTO, Eri MORITA, Yurie MIWA, Masahiro KOYAMA, Kozo NAKAMURA (Shinshu Univ)

【目的】当研究室ではコリンエステル類（アセチルコリン：AcCh，ブチリルコリン：BuCh，ラクトイルコリン：LaCh，プロピオニルコリン：PrCh）が経口摂取で高血圧自然発症ラットにおいて降圧作用を有することを示した。コリンエステル類の食品成分としての研究事例はなく，新規な食品機能性成分としての利用が期待される。そこで本研究では，LC-MS/MS を用いた上記コリンエステルおよびコリン（Ch）の同時定量法を開発し，生鮮農産物（野菜）を対象にコリンエステル類高含有食品の探索を行った。
【方法】コリン化合物の定量は，各試料の凍結乾燥粉末の振とう抽出溶液を陽イオン交換カートリッジで固相抽出した後，溶出液を LC-MS/MS 多重反応モニタリング（MRM）モードで分析し，標準添加法を用いて行った。分析条件を以下に示す。LC-MS/MS システム：ACQUITY UPLC， Waters Quattro micro API，カラム：YMC Triart-PFP（4.6×250 mm），カラム温度：40℃，移動相：0.010%ギ酸-33%メタノール含有水，流速：0.50 mL/min，イオン化方法：ESI（+），Cone：AcCh，BuCh，LaCh，PrCh 20 V，Ch 30 V，Collision：AcCh，PrCh 10 V，BuCh，Ch，LaCh 15 V。また各コリン化合物の定量値は，内部標準物質の回収率から固相抽出におけるロスを補正した。
【結果】標準添加法と MRM モードの使用により，定量対象以外の夾雑物質およびその影響（マトリックス効果）を効果的に除去できた。メソッドバリデーションの結果，日内再現性が 1%未満，日間再現性が 2%未満，回収率が 100±20%以内，検出限界および定量限界がそれぞれ 2.17 pmol，6.59 pmol と真度，精度および感度について優れた定量法となった。農産物は 19 種類定量し，全てにコリンエステルおよびコリンが含まれていた。今回測定した農産物の中で最もコリンエステル類含量が高かったのはナスであり，代表的なコリンエステルである AcCh 含量が新鮮重量（F.W）100 g 当たり 5.53 mg と，他の農産物の 1000 倍以上であった。同じナス科のトマト，パプリカ，ピーマン，ししとうの AcCh 含量はそれぞれ 100 gF.W 当たり $8.11\times10^{-4}$ mg，$1.80\times10^{-3}$ mg，$5.95\times10^{-3}$ mg，$1.55\times10^{-3}$ mg であり，定量を行ったナス科農産物ではナスだけのコリンエステル類含量が高かった。そこでナスの品種の違いによる AcCh 含量を検討した。その結果，品種間の AcCh 含量差は 2 倍程度であり，品種にかかわらずナスには AcCh が豊富に含まれることが分かった。以上の結果から，コリンエステル類は食品中に広く存在することが明らかとなり，特にナスはコリンエステル類が豊富であり，降圧作用を有する機能性食品素材として有望であることが分かった。

cholineester, lc-ms/ms, eggplant

発表責任者：中村浩蔵（knakamu@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2A07p14
講演日時：3 月 18 日 17:35～ A 校舎 07 会場

コリンエステル高含有農産物・ナスの高血圧自然発症ラットにおける抗高血圧作用
Antihypertensive effect of high cholinester‐containing agricultural product 'eggplant' in spontaneously hypertensive rats.
○松本 健督、山口 翔平、渡辺 旭、早崎 大輔、小山 正浩、中村 浩蔵（信州大農）
○ Kento MATSUMOTO, Shohei YAMAGUCHI, Akira WATANABE, Daisuke HAYASAKI, Masahiro KOYAMA, Kozo NAKAMURA (Shinshu Univ.)

【目的】
コリンエステルは、食経験豊富な新規食品機能性成分であると考えられる。きゅうり、キャベツ、ぶどうなどの生食に適した生鮮農産物 19 品種 を対象にコリンエステル含量調査を行ったところ、全ての農産物にコリンエステル（アセチルコリン（AcCh）、プロピオニルコリン、ブチリルコリン）が含まれており、代表的なコリンエステルである AcCh の割合が高かった。そして、ナスに、その他の農産物の 1,000 倍以上のコリンエステルが含まれていた。そこで本研究では、コリンエステル高含有農産物・ナスの抗高血圧作用を、高血圧自然発症ラット（SHR）を用いた血管等尺性張力試験および単回経口投与試験によって評価した。
【方法】
ナス（大阪府阪南市産、泉州水ナス）の凍結乾燥粉末を純水に懸濁させたものを、以降の試験に用いた。ナス凍結乾燥粉末中のコリンエステル定量は LC-MS を用いた標準添加法で行った。
血管等尺性張力試験： フェニレフリン収縮させた雄性 14 週齢 SHR 由来胸部大動脈血管リング標本に、ナス凍結乾燥物または AcCh 標準品を AcCh 終濃度が $10^{-9}$ から $10^{-6}$ M となるように累積添加し，張力変化を記録した。
単回経口投与試験： 24 時間絶食した雄性 14 週齢 SHR に、ナス凍結乾燥物または純水（対照群）を単回経口投与（n=6）し，投与前および投与 3、6、9、24 時間後に収縮期および拡張期血圧をテイルカフ法で測定した。
【結果】
SHR 胸部大動脈血管を用いた血管等尺性張力試験では、ナス凍結乾燥物は AcCh と同様の血管拡張作用を示し、主にナスに含まれる AcCh が、生体組織において M3 ムスカリン性アセチルコリン受容体に有効に作用することを確認した。SHR への単回経口投与試験では、ナス凍結乾燥物投与群の収縮期血圧が対照群と比較して投与 3 時間後と 9 時間後に有意に低下し、拡張期血圧は有意差はないものの投与 3 時間後と 9 時間後に低値を示した。ナス凍結乾燥物投与群の血圧変化パターンは AcCh 標準品とほぼ同じであり、ナスの降圧作用は主に AcCh によって引き起こされているものと考えられた。ナスは、食経験豊富で安全性が確認されているため、高血圧予防・改善を目的とした機能性食品素材としての応用が期待される。

cholinester, antihypertension, eggplant

講演番号：2A07p15
講演日時：3 月 18 日 17:50～ A 校舎 07 会場

テレメトリー法による高血圧自然発症ラットにおける経口投与コリンエステル類の血圧上昇抑制作用評価
Evaluation of antihypertensive effect of orally administrated choline esters on spontaneously hypertensive rats by telemetry
○高橋 佑介、渡辺 旭、早崎 大輔、山口 翔平、小山 正浩、中村 浩蔵（信州大農）
○ Yusuke TAKAHASHI, Akira WATANABE, Daisuke HAYASAKI, Shohei YAMAGUCHI, Masahiro KOYAMA, Kozo NAKAMURA (Shinshu Univ)

[目的]
ソバスプラウト乳酸発酵物（FBS）の抗高血圧成分として単離されたコリンエステル類は、これまで食品機能性成分としての報告はなく、新期食品機能性成分としての利用が期待される。コリンエステル類は極めて低用量（$10^{-8}$ mol/kg）の高血圧自然発症ラット（SHR）への経口投与で血圧低下作用を引き起こす。そこで本研究では、現在、最も客観的に生体データを測定できるテレメトリー法用いて、動脈圧および腎交感神経活動を無拘束・無麻酔下で連続記録し、FBS およびコリンエステル類反復経口投与による SHR における血圧上昇抑制作用を評価し、血圧上昇抑制メカニズムを検討した。
[方法]
まず SHR へのテレメトリーセンサ（Millar 社製）の埋め込み手術を行った。SHR（雄性 10 週齢、各群 n = 6）をイソフルラン麻酔下で開腹し、血圧センサを腹部大動脈に挿入後、生体用接着剤で固定・止血を行った。続けて、腎交感神経を剥離し、神経電位センサを取り付け、シリコン接着剤で固定し、腹腔内にセンサを留置した。術後 1 週間を回復期間とした後、FBS 投与群に FBS を 27 mg/kg（AcCh $10^{-8}$ mol/kg 相当）用量で、各コリンエステル類投与群に AcCh および当研究室で合成した D-LaCh および L-Lach を $10^{-8}$ mol/kg 用量で 30 日間反復経口投与した。コントロール群には純水を投与した。投与期間中、動脈圧および腎交感神経活動電位を自動的・連続的に記録した後、動脈圧波形から収縮期血圧、拡張期血圧を算出し、腎交感神経活動電位から一定の閾値を超えたものをスパイクとしてカウントした。
[結果]
コントロール群は、加齢に伴って収縮期血圧および拡張期血圧が上昇すると共に腎交感神経活動が亢進した。その一方で、FBS 投与群および各コリンエステル類投与群の血圧上昇はコントロール群と比較して有意に抑制され、腎交感神経活動も有意に低下した。研究に用いた被検サンプル中では D-LaCh が最も強い血圧上昇抑制作用および腎交感神経活動低下を示した。持続的な高血圧は、主に腎交感神経活動亢進による血中アドレナリン・ノルアドレナリン濃度の上昇により引き起こされると考えられている [1]。したがって、本研究の経口摂取コリンエステル類の抗高血圧作用は、自律神経系制御によるアドレナリン・ノルアドレナリン放出抑制により引き起こされたと考えられた。
1) Krum H, et al., *Lancet*, 373：1275-1281 (2009)

choline esters, spontaneously hypertensive rat, telemetry system

発表責任者：中村浩蔵（knakamu@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2A07p16
講演日時：3 月 18 日 18:05～ A 校舎 07 会場

# 酒粕の抗酸化性およびアンジオテンシン変換酵素阻害活性に及ぼす精米歩合および貯蔵の影響

# Effects of rice polishing ratio and storage conditions on the antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities of sake lees

○谷本 昌太[1]、岩佐 美月[1]、大石 綾乃[1]、田辺 詩織[1]、近藤 留未[2]、馬渕 良太[1]([1]県立広島大人間文化、[2]県立広島大院総合学術)
○Shota TANIMOTO[1], Mitsuki IWASA[1], Ayano OHISHI[1], Shiori TANABE[1], Rumi KONDO[2], Ryota MABUCHI[1] ([1]Pref. Univ. Hiroshima, [2]Grad. Sch. Pref. Univ. Hiroshima)

【目的】清酒製造時の副産物である酒粕は，米由来の成分と麹菌や酵母の菌体成分，またこれらの微生物が生産した葉酸などの代謝物が含まれており，栄養学的にたいへん優れた食品である。また，その機能性として，コレステロール上昇抑制効果などが報告されている。一方，我々は，前年度の本大会において酒粕の抗酸化性に対する精米歩合，製造方法の影響を報告した[1)]。そこで，今回，酒粕のアンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害活性について精米歩合および貯蔵の影響を検討するとともに，抗酸化性およびACE阻害活性とアミノ酸度，ペプチド含量およびポリフェノール含量との関連について検討した。
【実験方法】試料として，精米歩合の異なる清酒に由来する醸造後1 か月以内の酒粕を用いた。貯蔵試験は，酒粕を5℃また20℃で，0，30，90，120 日間行った。AEC阻害活性の測定は，基質(Hip-His-Leu)にACE（10mU/ml）の添加により遊離したHis-Leuをo-フタルアルデヒドより蛍光標識し，その強度により行った，ACE阻害成分の抽出には蒸留水を用いた。試料のACE阻害活性は，ACE活性を50%阻害する試料重量である$IC_{50}$として表した。アミノ酸度は，80％メタノールで抽出した試料を用いて国税庁所定分析法，ペプチド含量およびポリフェノール含量は，80％エタノールで抽出した試料についてBCA法を改変した方法およびフォーリン・チオカルト法によりそれぞれ測定した。
【実験結果】酒粕のACE阻害活性は，精米歩合が61%以上の酒粕で，50%以下の酒粕と比べて有意に低い$IC_{50}$値を示した（$P$<0.05）。ペプチド含量およびアミノ酸度に精米歩合による有意差は認められなかった。ポリフェノール含量は，精米歩合が61%以上の酒粕で，50%以下の酒粕と比べて有意に高い値を示した（$P$<0.05）。貯蔵試験の結果，35%の大吟醸酒に由来する酒粕において貯蔵温度20℃で$IC_{50}$値の有意な低下（$P$<0.05）が認められ，60%の純米酒に由来する酒粕はいずれの貯蔵温度においても1ヵ月の貯蔵で阻害活性が有意に低下した（$P$<0.05）。すなわち，酒粕のACE阻害活性は，精米歩合の低い酒粕で高く，精米歩合の高い酒粕では貯蔵条件の一部で増加することが示された。一方，アミノ酸度およびペプチド含量はともにいずれの精米歩合の酒粕も貯蔵中に有意に増加した（$P$<0.05）。以上の結果から，酒粕のACE阻害活性は，精米歩合の高いもので高く，酒粕によっては貯蔵により増加することが明らかになった。また，現在，抗酸化性およびACE阻害活性とアミノ酸度およびペプチド含量の間の相関分析を実施している。
1)谷本ら，酒粕の抗酸化性に及ぼす精米歩合および貯蔵条件の影響，日本農芸化学会2016年度札幌大会

sake lee, angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity, antioxidant activity

発表責任者：谷本昌太（s-tanimoto@pu-hiroshima.ac.jp）

講演番号：2A08a01
講演日時：3 月 18 日 09:20～ A 校舎 08 会場

# 食事性リン脂質の構成脂肪酸が腸管吸収過程における消化性に及ぼす影響

# Digestibility of dietary phospholipids with different fatty acid compositions

○室田 佳恵子[1]、平野 明伽音[1]、渡辺 嘉[2]、大久保 剛[3]（[1]近大理工、[2]大阪市工研、[3]仙台白百合女子大）
○Kaeko MUROTA[1], Akane HIRANO[1], Yomi WATANABE[2], Takeshi OHKUBO[3] ([1]Kindai Univ., [2]OMTRI, [3]Sendai Shirayuri Women's Col.)

【目的】海産物由来のリン脂質は、近年脳への DHA 供給に有効であることが示唆されている。我々は魚卵由来リン脂質の摂取が、小腸におけるリン脂質結合型 DHA の生合成とリンパ液への輸送を増加させることを明らかにした。このことは、DHA を構成脂肪酸にもつグリセロリン脂質の腸管での消化が、他のグリセロリン脂質とは異なるために起こったと考え、膵酵素による消化性について、構成脂肪酸の異なるグリセロリン脂質との比較を行った。
【方法】卵黄由来ホスファチジルコリン（EYPC）と、魚卵由来リン脂質（Roe-PL）を用い、ガスクロマトグラフィーを用いて脂肪酸組成を確認した。Roe-PL においては *Streptomyces* 由来ホスホリパーゼ A2 を用いて脂肪酸の結合位置解析も行った。次に、これらのリン脂質をブタ膵臓由来ホスホリパーゼ A2（PLA2）およびパンクレアチンとともに 37°C でインキュベートし、生じた遊離脂肪酸の脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーで解析した。また、TLC を用いて消化液の分画を行い、生じた遊離脂肪酸とリゾホスファチジルコリン（LPC）、および未消化で残存しているホスファチジルコリン（PC）を抽出した後、それぞれの構成脂肪酸を同様に解析した。
【結果および考察】EYPC は、主にパルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸の 4 種を含んでいた。酵素反応後に生じた遊離脂肪酸種は、PLA2 消化ではほぼオレイン酸とリノール酸のみであり、EYPC の *sn*-2 位には主にオレイン酸とリノール酸が結合していることが示唆された。パンクレアチン消化の結果、オレイン酸とリノール酸が PLA2 とほぼ同量遊離したのに加えて、パルミチン酸、ステアリン酸も遊離したことから、パンクレアチンには PLA1 活性が含まれることが示された。魚卵由来リン脂質の場合、PLA2 消化では DHA と EPA が多く検出され、これらは *sn*-2 位の主要脂肪酸であった。パンクレアチン消化では、パルミチン酸、ステアリン酸という *sn*-1 位の主要脂肪酸の方が多く遊離し、遊離脂肪酸としての DHA 量は有意に減少した。このとき DHA は、もう 1 つの消化産物である LPC としてではなく、残存する PC として増加していることが示唆された。EPA では PLA2 とパンクレアチンの違いは観察できず、これは EPA が *sn*-2 位と *sn*-1 位に同程度結合しているためではないかと考えられた。
【結論】DHA が *sn*-2 位に結合したグリセロリン脂質は、他の脂肪酸が *sn*-2 位に結合している場合に比べて膵液消化の際に加水分解されにくいことが示された。

DHA, Phospholipid, Digestion and absorption

発表責任者：室田佳恵子（murota@life.kindai.ac.jp）

講演番号：2A08a02
講演日時：3 月 18 日 09:35～ A 校舎 08 会場

# ライチ由来低分子化ポリフェノールである Oligonol の生体内コレステロールレベル低下作用の解明
# Elucidation of cholesterol-lowering effect of Oligonol, oligomerized polyphenol formulated from lychee fruit

○林 洪太[1]、河合 咲紀[1]、三田村 真里[1]、長田 恭一[1]、高成 準[2]、北舘 健太郎[2] ([1]明治大農、[2]アミノアップ化学)
○Kota HAYASHI[1], Saki KAWAI[1], Mari MITAMURA[1], Kyoiti OSADA[1], Jun TAKANARI[2], Kentaro KITADATE[2] ([1]Meiji University, [2]Amino Up Chemical)

【目的】
プロシアニジン化合物を低分子化してバイオアベイラビリティーを高めた Oligonol のコレステロール代謝制御作用について、抗菌薬混合物を投与した場合の効果と比較検討した。
【方法】
7 週齢の Wistar 系雄性ラットを予備飼育後、体重を基準に 3 群に分け、給餌 2 時間後に生理食塩水を経口投与した群を N 群(n=7)、Oligonol を 500mg/kg B.W./day のレベルで経口投与した群を O 群(n=6)、抗菌薬混合物(バシトラシン：ネオマイシン硫酸塩：ストレプトマイシン硫酸塩=1:1:1(v/v)混合物)を 450mg/kg B.W./day のレベルで経口投与した群を A 群(n=8)とし、さらに 5 日間飼育した。なお、飼料はコーン油 5%を含む AIN76 純化飼料をペアーフィーディング条件で与えた。5 時間の絶食後、麻酔を施して腹部動脈より採血死させて、各パラメータを測定した。
【結果】
体重 100g 当たりの盲腸重量は、N 群と比較して O 群が有意に高くなり、N 及び O の両群と比較して A 群が有意に高くなった。盲腸内容物中の短鎖脂肪酸濃度については、プロピオン酸濃度は N 群と比較して O 群が有意に高くなり、酪酸濃度は N 群と比較して O 群が有意に低くなった。また、A 群では盲腸内容物中に短鎖脂肪酸の存在をほとんど認めなかった。血漿中の総胆汁酸濃度は、N 群と比較して O 及び A の両群が有意に低くなった。肝臓の総コレステロール濃度は、N 及び A の両群と比較して O 群が有意に低くなった。肝臓の CYP7A1 の mRNA レベルは N 群と比較して O 群では高くなる傾向となり、A 群では有意に高くなった。糞中に排泄された中性ステロイド濃度と胆汁酸濃度は、N および A の両群と比較して O 群が有意に高くなった。
【考察】
Oligonol または抗菌薬混合物の投与により、盲腸が肥大化して重量が顕著に増大した。抗菌薬混合物の投与では盲腸内容物中の短鎖脂肪酸が消失したのに対し、Oligonol の投与ではその総量に変化を与えず、プロピオン酸濃度の上昇および酪酸濃度の低下という組成変化が生じた。盲腸内の pH に関して現在検討中である。肝臓のコレステロール異化反応の律速酵素である CYP7A1 の mRNA レベルは、Oligonol 投与で上昇したが、抗菌薬混合物投与でより顕著に上昇した。しかし、肝臓の総コレステロール濃度は Oligonol 投与でのみ低下しており、その機構には中性ステロイドおよび胆汁酸の排出亢進が大きく寄与していることが推測された。

Oligonol, Gut microbiota, Cholesterol

発表責任者：林洪太（busterkun918@gmail.com）

講演番号：2A08a03
講演日時：3 月 18 日 09:50～ A 校舎 08 会場

# 卵白タンパク質由来の新規コレステロール代謝改善ペプチド SRLY の発見

# Identification of a novel hypocholesterolemic peptide SRLY from egg white protein

○内山 裕香、坪井 俊樹、島田 昌也、長岡 利 (岐阜大学応用生物科学部食品分子機能学研究室)
○Yuka UCHIYAMA, Toshiki TSUBOI, Masaya SHIMADA, Satoshi NAGAOKA (Gifu University)

【目的】

卵は良質なタンパク質源であり、栄養的に最も優れた食品の一つであるが、コレステロールを多く含むため、脂質異常症、冠動脈心疾患などのリスク上昇が懸念され、敬遠されている。しかし、卵白タンパク質の摂取はヒトや動物において、血清コレステロールを減少させることが報告されている。また、当研究室の実験において卵白タンパク質の酵素分解物（EP-1）の摂取により、ラットの血清コレステロールと肝臓総脂質が減少し、糞中総ステロイド排泄量が増加した。さらに、コレステロール分解系の律速酵素であるコレステロール 7α-水酸化酵素（CYP7A1）の mRNA レベルが増加傾向を示したことから、この現象には CYP7A1 によるコレステロールの分解促進が関与すると考えられる。しかし、この効果をもたらすペプチドの本体は不明である。そこで本研究は、ヒト培養肝臓細胞 HepG2 を用いて、CYP7A1 の mRNA レベルを評価基準とし、EP-1 の可溶性ペプチド混合物（EP-1S）からコレステロールの分解を促進するペプチドの本体を明らかにすることを目的とする。

【方法・結果】

EP-1S を用いた活性ペプチドの分画・分取は、様々な溶出条件を検討した後、逆相クロマトグラフィーを用いて行った。得られた画分を HepG2 に添加し 24 時間後に総 RNA を回収、CYP7A1 の mRNA レベルを測定した。得られた画分のうち Fraction 4 が CYP7A1 の mRNA レベルを増加させた。この Fraction 4 を逆相クロマトグラフィーでさらに分画・分取し、CYP7A1 mRNA レベルの評価を行った。得られた画分のうち Fraction 42 が最も CYP7A1 mRNA レベルを増加させた。続いて MALDI-TOF-MS/MS により Fraction 42 に含まれるペプチドの解析を行い、卵白オボアルブミン由来のアミノ酸配列である Ser-Arg-Leu-Tyr（SRLY）を同定した。SRLY の HepG2 への添加は CYP7A1 mRNA 及びタンパク質レベルを増加させることを明らかにした。さらに、CYP7A1 遺伝子転写に関与する肝特異的転写因子 HNF-3α の mRNA 及びタンパク質レベルも増加した。我々は卵白オボアルブミンからコレステロール分解に関与する CYP7A1 を活性化する新規ペプチド SRLY を世界で最初に発見し、その作用は HNF-3α を介している可能性を示した。

egg white, CYP7A1, cholesterol

発表責任者：長岡　利（nagaoka@gifu-u.ac.jp）

講演番号：2A08a04
講演日時：3 月 18 日 10:05～ A 校舎 08 会場

# ラクトスタチン（IIAEK）は肝特異的転写因子 HNF-3αを介してコレステロール分解系を活性化する

# Lactostatin activates cholesterol degradation pathway via hepatocyte specific nuclear factor HNF-3α signaling.

○大林 由季奈、磯貝 渚、井辰 かおる、島田 昌也、長岡 利 (岐阜大学応用生物科学部・食品分子機能学研究室)
○Yukina OBAYASHI, Nagisa ISOGAI, Kaoru ITATSU, Masaya SHIMADA, Satoshi NAGAOKA (Gifu University)

【目的】

コレステロール 7α-水酸化酵素（CYP7A1）は肝臓のコレステロール分解系律速酵素であり、CYP7A1 遺伝子の活性化により動脈硬化症が抑制されることが知られている。当研究室の研究より、牛乳乳清 β-ラクトグロブリン由来ペプチドであるラクトスタチン（IIAEK）は、ヒト培養肝細胞 HepG2 において、ラクトスタチン（1mM）の添加により、CYP7A1 の mRNA、タンパク質、遺伝子転写活性化が有意に増加した (1)。また、DNA マイクロアレイにおいて、CYP7A1 転写活性化因子の一つである HNF-3α の mRNA の有意な上昇を観察した。そこで本研究では、CYP7A1 遺伝子プロモーター上の HNF-3α 結合領域に注目しラクトスタチンの CYP7A1 遺伝子転写活性化機構を解明すると共に、CYP7A1 遺伝子活性化を媒介するシグナル経路を特定することを目的とする。

【方法・結果】

ルシフェラーゼ分析により、CYP7A1 遺伝子転写活性化は、CYP7A1 遺伝子プロモーターの HNF-3α 領域の欠損により消失することを明らかにした。さらに、siRNA を用いて HNF-3α をノックダウンした HepG2 細胞にラクトスタチンを添加し、リアルタイム RT-PCR により CYP7A1 mRNA レベル及び、ウエスタンブロット法により CYP7A1 タンパク質レベルを測定した。その結果、HNF-3α のノックダウンにおいて、ラクトスタチンによる CYP7A1 mRNA レベルの誘導及び、CYP7A1 タンパク質レベルの有意な減少が観察された。また、HepG2 細胞にラクトスタチンを 6 時間添加し、回収した RNA を用いて DNA マイクロアレイを行い、ラクトスタチンが影響を与える遺伝子を網羅的に解析した。得られたデータを過去に実施した DNA マイクロアレイ（ラクトスタチンを 24 時間添加した実験）データと共に GeneSpring 並びに IPA（Ingenuity Pathway Analysis）により解析した。その結果、ラクトスタチン 6 時間添加において最も有意な変化を示したパスウェイは Arylhydrocarbon receptor (AhR) signaling pathway であり（p value：6.78E-05）、ラクトスタチン 24 時間添加において最も有意な変化を示したパスウェイは NRF2 pathway であった（p value：5.77E-07）。

(1) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352, 697-702 (2007)

Lactostatin, Cholesterol 7α- hydroxylase, Hepatocyte nuclear factor 3α

発表責任者：長岡利（nagaoka@gifu-u.ac.jp）

講演番号：2A08a05
講演日時：3 月 18 日 10:20～ A 校舎 08 会場

# エピガロカテキンガレート（EGCG）は 67kDa Laminin Receptor （67LR）を介さない ERK 経路でコレステロール代謝改善作用を発揮する

# Epigallocatechin gallate exerts an action to improve cholesterol metabolism by a novel ERK pathway not mediated by 67kDa laminin receptor.

○岡田 雄大、北村 幸平、島田 昌也、長岡 利 (岐阜大学応用生物科学部食品分子機能学研究室)
○Yudai OKADA, Kouhei KITAMURA, Masaya SHIMADA, Satoshi NAGAOKA (Gifu University)

【目的】緑茶に含まれる主要なポリフェノールであるエピガロカテキンガレート(EGCG)は血漿 LDL レベルの上昇を抑制し、抗動脈硬化作用を示すことが報告されている。我々は EGCG が LDL 受容体 (LDLR) を増加させ、その分解促進因子である PCSK9 レベルを減少させることを報告した。また EGCG が ERK 経路を介して LDLR を活性化することを報告した。現在、高コレステロール血症の治療薬として一般にスタチンが使用されている。スタチンは LDLR レベルを増加させると同時に、PCSK9 レベルを増加させることが知られている。本研究では、EGCG とスタチンをヒト培養肝臓細胞 HepG2 に同時添加することで、EGCG がスタチンの効果を増強するかどうかを LDLR と PCSK9 レベルに与える影響により検討した。また、近年 EGCG の受容体として 67 kDa Laminin Receptor (67LR) が見出され、EGCG による 67LR を介する抗ガン作用シグナルや抗炎症作用シグナルが 67LR を抗体で阻害することによって消失することが報告された。このことを受けて EGCG の LDLR 活性化作用の起点となる受容体が 67LR である可能性を考え、67LR モノクローナル抗体処理時に EGCG がもたらす LDLR や PCSK9 mRNA レベル等に与える影響を検討した。

【方法】<実験 1>Control 群、25μM EGCG 群、1μM Lovastatin 群、25μM EGCG 群 + 1μM Lovastatin 群の 4 群を用いて実験を行った。各群を HepG2 細胞に 24 時間処理した後、【A】RT-PCR によって LDLR と PCSK9 mRNA レベルを、【B】ウェスタンブロットによって LDLR と PCSK9 タンパク質レベルを、【C】ELISA によって PCSK9 タンパク質レベルを測定した。
<実験 2> Control + Control 抗体群、25μM EGCG + Control 抗体群、Control + 67LR 抗体群、25μM EGCG + 67LR 抗体群の 4 群を用いて実験を行った。HepG2 細胞に 1 時間抗体前処理した後、24 時間サンプルで処理し、各群を RT-PCR を用いて LDLR と PCSK9 mRNA レベルを測定した。
【結果】<実験 1>EGCG、Lovastatin のそれぞれの単独利用では LDLR mRNA とタンパク質レベルは有意に増加したが、EGCG と Lovastatin の併用利用では、さらに LDLR mRNA とタンパク質レベルの増加が増強された。また EGCG はスタチンによる PCSK9 の増加を抑制した。よって、EGCG と Lovastatin の併用利用は高コレステロール血症治療に寄与する可能性をもつことが示唆された。
<実験 2>67LR 抗体処理は EGCG による LDLR mRNA レベルの増加作用に対する影響が見られなかった。したがって、EGCG による LDLR の活性化は 67LR を介さない ERK 経路を媒介することを発見した。

EGCG, 67LR, Statin

発表責任者：長岡利（nagaoka@gifu-u.ac.jp）

講演番号：2A08a06
講演日時：3 月 18 日 10:45～ A 校舎 08 会場

テアフラビンが胆汁酸吸収トランスポーター活性に与える影響
Effects of theaflavin on the activity of intestinal bile acid transporters
○石川 和樹 [1]、小川 真奈 [1]、石井 剛志 [2]、阿部 啓子 [1,3]、小林 彰子 [1] ([1] 東大院農、[2] 神戸学院栄、[3] 神奈川科学技術アカデミー)
○Kazuki ISHIKAWA[1], Mana OGAWA[1], Takeshi ISHII[2], Keiko ABE[1,3], Syoko KOBAYASHI[1] ([1]Tokyo Univ., [2]Kobe Gakuin Univ., [3]KAST)

【目的】食後胆管を通じて腸管に排出される胆汁酸の 95%は、小腸下部に発現する胆汁酸トランスポーター(apical sodium-dependent bile acid transporter , ASBT)から再吸収され、肝臓へと運ばれて、再び腸管へ分泌される（腸肝循環）。肝臓で生合成される胆汁酸はコレステロールを原料とするため、腸管からの胆汁酸の再吸収抑制はコレステロールからの胆汁酸への変換を促進し、血中コレステロールの低下をもたらす。現在、胆汁酸を吸着し血中コレステロールを低下させる薬剤としてコレスチラミンがあるが、ASBT を直接阻害し、血中コレステロールを低下させる成分はほとんど報告されていない。本研究は、ASBT を阻害し、脂質異常症を改善させる成分を食品素材の中から探索すること、およびその阻害機構を明らかにすることを目的とした。
【方法】小腸上皮のモデルとしてヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞を用いた。食品成分として、脂質異常症を改善するなどの疫学的知見の多いポリフェノールに着目した。Caco-2 細胞をそれぞれのポリフェノールでプレインキュベートした後、[$^3$H]タウロコール酸を添加し、一定時間後 Caco-2 細胞に取り込まれたタウロコール酸量を液体シンチレーションカウンターで測定した。阻害活性の最も高かった化合物については、時間依存性および濃度依存性などの速度論的解析により阻害様式を明らかにした。また、ASBT を強制発現させたヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞を用いた取り込み試験によっても、阻害活性を評価した。
【結果・考察】食品中に含まれるポリフェノール 40 種類をスクリーニングした結果、14 種のポリフェノールが有意に胆汁酸の取り込みを阻害した。なかでもカテキン類の重合体であるテアフラビン 2 種が最も高い活性を示した。これらのテアフラビンは、ウオッシュアウト後においても阻害活性を保持していたことから、ASBT に作用していることが示唆された。さらにこれらのテアフラビン濃度を一定にし、基質の濃度依存阻害活性を Hanes-Woolf plot により解析した結果、*V*max は低下した一方、*K*m は変化しなかったことから、これらのテアフラビンは ASBT に対し、基質と同じ部位に結合する可能性が示唆された。ASBT を強制発現させた HeLa 細胞においても同様の取り込み試験を行った結果、Caco-2 細胞の場合と同等の阻害活性を示したことから、ASBT の働きを抑制することにより胆汁酸取り込みを阻害している可能性が示唆された。現在は ASBT の変異体を作製し、テアフラビン類の阻害部位を検討している。本研究の一部は，総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」の助成によって実施された。

theaflavin, bile acid, ASBT

講演番号：2A08a07
講演日時：3 月 18 日 11:00～ A 校舎 08 会場

ベタイン摂取がラットの脂質代謝に及ぼす影響
Effects of Dietary Betaine Supplementation on Lipid Metabolism in Rats
○溝上 拓哉[1]、林 拓也[1]、田中 愛健[2]、城内 文吾[1]、石塚 敏[2]、名倉 泰三[3]、福島 道広[4]、佐藤 匡央[1] ([1]九大院・農、[2]北海道大院・農、[3]日本甜菜製糖、[4]帯畜大・食品科学)
○Takuya Mizokami[1], Takuya Hayashi[1], Yasutake Tanaka[2], Bungo Shirouchi[1], Satoshi Ishizuka[2], Taizou Nagura[3], Michihiro Fukushima[4], Masao Sato[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Hokkaido Univ., [3]Nihon tensai seitou, [4]Obihiro Univ.)

**【緒言】**Betaine（Trimethylglycine）は肝臓においてホモシステイン異化の際のメチル基供与体として利用される。ラットおよびマウスにおいて、Betaine の食餌摂取は肝臓への脂質蓄積を抑制することが報告されており、脂肪性肝炎などといった肝疾患の改善に有効であることが示唆されている。しかし、その作用機序については未だ明らかとなっていない。そこで、Betaine 摂取が肝臓の脂質代謝に及ぼす影響とそのメカニズムの解明を目的として実験を行った。
**【方法】** 4 週齢雄性 SD ラットを 1 週間の予備飼育後、AIN-76 組成に準じコーン油 5%及びコレステロール 0.2%を添加した Control 食および Control 食に含まれる Sucrose のうち 3%を Betaine に置き換えた Betaine 食を 3 週間与えて飼育した。屠殺前 2 日分の糞を回収し、9 時間の絶食条件下で大動脈採血による屠殺を行った。得られた血清中の脂質濃度は酵素法により測定した。Folch 法により肝臓総脂質を抽出し、トリアシルグリセロール濃度は酵素法により、コレステロールおよびその前駆体の濃度は内部標準 5α-Cholestane を用いた GC-FID により測定した。また、糞中胆汁酸濃度は内部標準 Nordeoxycholic acid を用いた LC-MS により測定した。
**【結果・考察】**血清および肝臓トリアシルグリセロール濃度に群間で有意な差は認められなかった。Betaine 摂取により肝臓コレステロール濃度は有意に低下した。肝臓コレステロール濃度を調節する因子として、肝臓におけるコレステロール合成、血中からの取り込み、そして肝臓からの排出が考えられる。 Betaine 摂取により血清コレステロール濃度、とくに HDL-コレステロール濃度が有意に増加した。また、コレステロール合成前駆体である Squalene、Desmosterol および 7-Dehydrocholesterol の肝臓中濃度が Betaine 摂取により有意に低下した。さらに Betaine 摂取により、一次胆汁酸である Chenodeoxycholic acid、β-Muricholic acid の糞中濃度が有意に上昇した。コレステロール合成前駆体の肝臓中濃度が有意に低下したことから、Betaine 摂取により肝臓においてコレステロールの合成が抑制されたことが示唆された。また一次胆汁酸の糞中濃度が有意に上昇したことから、Betaine 摂取により肝臓コレステロールの胆汁酸排出が促進されたことが示唆された。以上のことから、Betaine 摂取による肝臓コレステロール濃度の低下は、合成の低下と胆汁酸としての排出の上昇に起因するものであると考えられる。血中からの取り込みおよび血中への排出に関しては現在解析中である。

Betaine, Cholesterol synthesis, Bile acid excretion

講演番号：2A08a08
講演日時：3 月 18 日 11:15～ A 校舎 08 会場

# 胆汁酸誘導性未病状態の脱脂乳チーズによる改善作用

# Amelioration of bile acid-induced mild disorders by ingestion of skimmed-milk cheese

○高橋 勇太郎[1]、李 東根[1]、李 娟美[1]、趙 佳賢[1]、加茂 佳恵[1]、多田 幸司[1]、堀 将太[1]、花井 健人[1]、竹内 あかり[1]、田中 愛健[1]、清水 英寿[2]、若松 純一[1]、原 博[1]、石塚 敏[1]、玖村 朗人[1]([1]北大農、[2]島根大生資)

○Yutaro TAKAHASHI[1], Dongguen LEE[1], Yeonmi LEE[1], Gahyun JOE[1], Yoshie KAMO[1], Koji TADA[1], Shota HORI[1], Taketo HANAI[1], Akari TAKEUCHI[1], Yasutake TANAKA[1], Hidehisa SHIMIZU[2], Jun-ichi WAKAMATSU[1], Hiroshi HARA[1], Satoshi ISHIZUKA[1], Haruto KUMURA[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Shimane Univ.)

メタボリックシンドロームの発症原因の一つである高脂肪食の摂取は、胆汁酸の分泌を増加させることが報告されている。胆汁酸は肝臓で合成され、生体における主なステロイド排泄形態として知られる一方で、消化管内においては脂質吸収に寄与し、回腸末端で再吸収されるものと糞便中へ排泄されるものがある。我々は、加齢に伴い増加する一次胆汁酸であるコール酸(CA)を 0.05%添加した飼料をラットに摂取させることにより、非肥満型脂肪肝、消化管透過性の亢進、血中 adiponectin(APN)濃度の低下など、重篤な疾患につながりうる様々な軽度異常、すなわち未病状態を呈することを見出した。本研究では、上記異常の改善に摂取食品が寄与するか否かを検討するため、タンパク源として脱脂乳チーズを用い、CA 摂取ラットにおける各種不具合と胆汁酸代謝を検討した。WKAH/HkmSlc 雄性ラット(3 週齢)を予備飼育後、AIN-93G 準拠飼料を与えた対照群、0.05%CA 添加食を与えた群(CA 群)、および CA 群食のタンパクをゴーダタイプの製法に倣い、脱脂乳を用いて製造したチーズ（3 ヶ月熟成）に置換した飼料を与えた群(CAC 群)の 3 群に分けて 2 週間飼育した。解剖前日に非吸収性マーカーである Cr-EDTA を経口投与し、翌日までの尿に含まれる Cr を原子吸光法で定量した結果から尿中排泄率を算出して消化管透過性の指標とした。解剖時に肝臓を採取して脂質蓄積を、動脈血漿を採取して血中 APN 濃度を ELISA 法で解析した。また、解剖時の糞、門脈血漿、肝臓の胆汁酸組成および濃度を LC-MS を用いて解析した。CA 群で生じた肝臓トリグリセリド・コレステロール蓄積、消化管透過性の亢進、及び血中 APN 濃度の低下は、CAC 群において部分的に改善された。CA 群で起こる糞中胆汁酸濃度の増加は CAC 群で抑制され、門脈血漿と肝臓~~中~~胆汁酸濃度については、群間差はみられなかった。生体内におけるステロイドの分解は容易ではないことから、脱脂乳チーズ添加食はステロイドの排泄経路または排泄形態を変化させることにより、コール酸負荷によって引き起こされる各種不具合の改善に寄与する可能性が考えられた。

bile acid, cheese

講演番号：2A08a09
講演日時：3 月 18 日 11:30～ A 校舎 08 会場

# 日本食と地中海食の健康有益性比較

# Health benefits comparison of Japanese and Mediterranean diets

○溝脇 由衣[1]、菅原 沙恵子[1]、山本 和史[1]、坂本 有宇[1]、岩垣 ゆい[1]、川上 祐生[2]、五十嵐 美樹[3]、都築 毅[1]([1]東北大院農、[2]岡山県大、[3]理研統合生医)
○ Yui MIZOWAKI[1], Saeko SUGAWARA[1], Kazushi YAMAMOTO[1], Yu SAKAMOTO[1], Yui IWAGAKI[1], Yuki KAWAKAMI[2], Miki IGARASHI[3], Tsuyoshi TSUDUKI[1] ([1]Grad. Sch. of Agric. Sci., Tohoku Univ., [2]Okayama Pref. Univ., [3]RIKEN Yokohama Branch)

【目的】世界有数の長寿国である日本の食事「日本食」は、健康食として注目されている。しかし、日本食に関するエビデンスは、健康的利点を示す疫学的研究や臨床介入試験だけでなく、その食事組成に関する詳細な情報も乏しい。そこで、以前我々は“日本食まるごと”をマウスに与えることで、日本食の健康有益性を科学的に検証し、現代日本食は現代アメリカ食に比べてストレス性が低く、代謝が活発化するために肥満になりにくいことを遺伝子レベルで明らかとした。さらに、様々な年代の日本食の中で、1975 年日本食が最も健康有益性の高いことを明らかにした［1]。一方、以前に世界 7 カ国を対象に行われた、食文化の違いと虚血性心疾患の疫学研究により、地中海沿岸諸国ではアメリカや北欧に比べて生活習慣病発症率および死亡率が低いことが示された。以来、この地域の食事は「地中海食」として注目され、その健康効果およびメカニズムについて多くの研究が行われてきた。しかし、日本食と地中海食を比較した研究はほとんどない。そこで本研究では、最近我々が健康有益性を示した 1975 年当時の日本の食事を日本食、地中海沿岸諸国で最も平均寿命の長いイタリアの食事をイタリア食とし、日本食とイタリア食をまるごとマウスに与えることで健康有益性の比較を行った。
【方法】試験食である日本食およびイタリア食は、それぞれ FAO STAT の Food Balance Sheets の 1975 年日本および 2010 年イタリアのデータに基づいて、管理栄養士の指導の下 7 日分 21 食の献立を作成、調理、凍結乾燥、粉砕して混合して作製した。ICR マウス（5 週齢、雄性）を試験食で 4 週間飼育し、9 週齢にて屠殺、血清や各種臓器を採取し、種々の分析に供した。
【結果】イタリア食群と日本食群間に摂取エネルギー量に差はなかったが、内臓脂肪重量や肝臓重量はイタリア食群に対して日本食群で有意に低値であった。そこで精巣周囲脂肪組織および肝臓の組織学的観察を行ったところ、精巣周囲脂肪組織の細胞面積はイタリア食群に対して日本食群で有意に小さく、また、肝臓における脂肪蓄積はイタリア食群に対して日本食群で少ない様子が観察された。メカニズムを検討するために脂肪酸代謝関連遺伝子の発現量を測定したところ、脂肪酸合成に関わる遺伝子の発現量はイタリア食群に対して日本食群で低く、一方、脂肪酸異化に関わる遺伝子の発現量はイタリア食群に対して日本食群で高い傾向が見られた。以上より、日本食はイタリア食と比較して、脂肪酸合成を抑制し、脂肪酸異化を活性化することで内臓および肝臓の脂肪蓄積を抑制することが明らかとなった。

[1] K. Yamamoto, T. Tsuduki, et al., Nutrition, 32, 122-128 (2016).

Japanese diet, Mediterranean diet, mice

講演番号：2A08a10
講演日時：3 月 18 日 11:45～ A 校舎 08 会場

異なる年代の日本食の成分比較とその応用
Comparison of the Japanese diet ingredients in various ages
○都築 毅[1]、坂本 有宇[1]、菅原 沙恵子[1]、菅原 達也[2]、木村 和彦[3] ([1]東北大院農、[2]京大院農、[3]宮城大食産業)
○Tsuyoshi TSUDUKI[1], Yu SAKAMOTO[1], Saeko SUGAWARA[1], Tatsuya SUGAWARA[2], Kazuhiko KIMURA[3] ([1]Grad. Sch. of Agri. Sci., Tohoku Univ., [2]Grad. Sch. of Agri. Sci., Kyoto Univ., [3]Miyagi Univ.)

【目的】日本が長寿国になった要因の一つとして、日本食の影響が考えられている。これまでに、特徴的な成分については数多く研究されてきたが、日本食まるごとが健康状態に及ぼす影響について、科学的に検討した研究はほとんどなかった。以前我々は、現代日本食と現代米国食を比較し、現代日本食は現代米国食よりも健康有益性が高いことを明らかとした [1]。また、日本食はここ 50 年で欧米の影響を受けてその内容が大きく変化してきており、どの年代の日本食が健康維持に有益か分からなかった。そこで、1960 年、1975 年、1990 年、2005 年の日本食の健康有益性を比較するために、各年代の食事を凍結乾燥・粉末化しマウスに与えたところ、1975 年の日本食が最も内臓脂肪蓄積を抑制するなど高い健康有益性を示した [2-4]。しかし、日本食まるごとに含まれるどの成分が内臓脂肪蓄積を抑制したのか分からなかった。そこで、本研究では、各年代の日本食に含まれる成分を様々な質量分析器で一斉分析し、1975 年の日本食で特徴的な成分の探索を行った。
【方法・結果】各年代の日本食について CE-TOFMS を用いたイオン性代謝物の分析では、測定可能な約 900 個のうち 261 個の成分が、LC-TOFMS を用いた脂溶性代謝物の分析では、測定可能な約 300 個のうち 66 個の成分が、ICP-MS を用いたミネラルの分析では、測定可能な約 70 元素のうち 34 個の成分が検出できた。得られた 3 つの結果を統合し、主成分分析を行ったところ、各年代の日本食は成分的に大きな差異を有していた。第 1 主成分では年を追うごとに高値または低値を示している成分が抽出され、第 2 主成分では 1975 年の食事を中心に高値または低値を示す成分が抽出された。1975 年の食事を中心に高い健康有益性が示されているので、この第 2 主成分として抽出された成分に健康有益性を示す要因が含まれていることが示唆された。そこで、抽出成分を含む食材を検索したところ、魚類、大豆食品、野菜、鰹節、果物、緑茶等に多く含まれることが分かった。さらに、この食材を強化した食事を作製し、マウスに与えたところ、特にコレステロール代謝において有益な効果が確認できた。以上より、1975 年の食事で多く含まれる成分は、魚類、大豆食品、野菜、鰹節、果物、緑茶等に多く含まれるものであり、これらの食材の強化は高い健康効果をもつことが示された。
[1] T. Tsuduki, et al., J Jpn Soc Nutr Food Sci, 61, 255-264 (2008).
[2] T. Honma, T. Tsuduki, et al., Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, 60, 541-553 (2013).
[3] Y. Kitano, T. Tsuduki, et al., J Jpn Soc Nutr Sci, 2, 73-85 (2014).
[4] K. Yamamoto, T. Tsuduki, et al., Nutrition, 32, 122-128 (2016).

Japanese diet, mass spectrometry, mice

講演番号：2A08p01
講演日時：3 月 18 日 14:00～ A 校舎 08 会場

マカ摂取ラット肝臓での脂肪酸代謝に関わる遺伝子発現の変化
Differential gene expression analysis in liver tissue of Maca-fed rat
○宮崎 麻美、緒方 みさと、内山 文昭（中村大院栄養）
○Asami MIYAZAKI, Misato OGATA, Fumiaki UCHIYAMA (Nakamura Gakuen Univ.)

背景：肥満や糖尿病をはじめとする生活習慣病の予防や改善には、脂質の摂取コントロール及び脂質代謝の改善が重要である。そのためには様々な食物の有効利用が益々盛んになることが期待される。我々は食物アブラナ科の多年生植物 *Lepidium meyenii* Walp.の根（一般名：マカ）を選定し、その生理作用を解明している。ラットにマカを摂取させ、肝臓の遺伝子発現レベルの変化から肝臓での機能を解析し、β酸化に関わる遺伝子発現の特異的な変化を考察した。
方法：マカの根の粉末は南米ペルーのフニンで栽培し、乾燥してものを用いた。植物鑑定およびケミカルプロファイリングから *Lepidium meyenii* Walp.の根であることを同定した。50%w/w のマカ根の有無による 2 種類の飼料をラットに 2 週間、自由摂食させたのち、肝臓を摘出した。肝臓から抽出した total RNA はアジレント 2100 バイオアナライザーで品質検定した。Total RNA は Agilent 社のラット用チップで一色法の DNA microarray 解析を行い、コントロール群(n=3)とマカ摂食群(n=3)の遺伝子発現データを比較した。
結果： コントロール群とマカ摂食群間における house keeping 遺伝子の発現は群間比率(fold 表示)、Gapdh (fold=1.0)、 Actb (fold=1.1, 有意差なし)、Rplp2 (fold=1.1, 有意差なし)、B2m (fold=1.1,有意差なし)、Tbp (fold=1.0)、Rps18 (fold=1.1, 有意差なし)から各ダイナミックレンジにおける発現差異はなかった。脂肪酸代謝として、β酸化に関わる酵素群についてコントロール群とマカ摂食群間における遺伝子発現差異を $t<0.05$ の有意差で検討した。Acyl-CoA synthetase では、長鎖脂肪酸に特異的な Acsl5 遺伝子は fold=0.7, 中鎖脂肪酸に特異的な Acsm2 遺伝子は fold=2.2、Avsm5 遺伝子は fold=3.8、短鎖脂肪酸に特異的な Acss 遺伝子発現に差異はなかった。Acyl-CoA dehydrogenase family 遺伝子発現に差異はなかった。不飽和脂肪酸に特異的な 2,4-dienoyl CoA reductase 1 は fold=1.2 に上昇していた。また、carnitine O-acetyltransferase ミトコンドリア内膜に acyl CoA を運搬では、Crat 遺伝子は fold=1.9 上昇していた。一方、Acetyl-CoA thioeaterase 遺伝子(Acot)は、細胞内の Acyl-CoA, 遊離脂肪酸、CoA-SH のレベルを調整していると考えられており、最も発現量の多い Acot５が fold=2.4 に上昇していた。
考察：今回の結果はマカに含まれている不飽和脂肪酸の濃度上昇に伴い、不飽和脂肪酸のβ酸化に関わる遺伝子発現が上昇していた。また、マカ摂取による Acot５の上昇は細胞質内の脂肪酸濃度の上昇に繋がっており、脂肪酸代謝に大きく影響していると考えられる。

DNA microarray, Acot5, Maca

発表責任者：内山　文昭（uchiya-f@nakamura-u.ac.jp）

講演番号：2A08p02
講演日時：3 月 18 日 14:15～ A 校舎 08 会場

# マアジをすり身素材として利用する際の水晒しの回数の違いがラットの脂質代謝に及ぼす影響

# Effect of feeding water-leached mackerel on lipid metabolism in rats

○原口 翼[1]、土橋 葵[1]、水田 成美[1]、青木 啓武[1]、武山 藍[1]、野中 知夏[1]、桑原 浩一[2]、田中 一成[1] ([1]長崎県大・栄養健康、[2]長崎県総合水試)
○Tsubasa Haraguchi[1], Aoi Tsuchihashi[1], Narumi Mizuta[1], Hiromu Aoki[1], Ai Takeyama[1], Chika Nonaka[1], Kouichi Kuwahara[2], Kazunari Tanaka[1] ([1]Univ. Nagasaki, [2]Nagasaki Pref. Fish. Exp. Stat.)

【目的】マアジは長崎県の主要な水産物で、漁獲量が日本一である。長崎県では魚肉ねり製品の製造が盛んに行われ、多様な魚種を利用する技術を開発し、マアジも利用されている。ねり製品の製造では水晒しを行うが、この行程で魚に含まれる脂質や水溶性タンパク質を取り除くことにより、すり身特有の弾力性が得られる。一般に練り製品の製造では数回の水晒しを行うが、魚に含まれる脂質などの機能性を有する成分が減少する可能性がある。本研究では、すり身の原料としてマアジを利用する際の水晒しの回数を変え、それらをラットに摂食させて血清および肝臓の脂質濃度を測定することで、水晒しの回数の違いがすり身素材としての機能性に及ぼす影響を検討した。
【方法】マアジは長崎県近海で水揚げされたものを使用した。試料はマアジの落とし身およびマアジ落とし身を 1 回または 6 回水晒しし、凍結乾燥して粉末状にしたものを用いた。マアジ落とし身の脂質含量は 11.9%、1 回水晒しで 7.9%、6 回水晒しにおいては 7.0%であった。AIN-93G 組成に基づき調製した飼料に、コレステロール(Chol)を 0.1%添加したものをコントロール (CO) 食とした。マアジ、1 回水晒しおよび 6 回水晒しした凍結乾燥粉末をそれぞれ CO 食のたんぱく質 20%レベルと置き換え、各群の脂質含量を大豆油で 7%にし、Chol 含量を 0.1%に調整した。これらの飼料を 6 週齢 SD 系雄ラットに 3 週間自由摂食させ、6 時間絶食後解剖し、血清および肝臓脂質濃度、血清ホルモン濃度、肝臓脂肪合成関連酵素活性、糞中ステロイド排泄量を測定した。
【結果・考察】摂食量および体重増加量に群間で差は認められなかった。血清中性脂肪(TG)濃度、血清 Chol 濃度、血清遊離脂肪酸濃度は CO 群と比較してマアジ群、1 回および 6 回水晒し群で有意に低値を示したが、マアジ群と水晒し群において差はなかった。血清インスリン濃度は CO 群と比較して 6 回水晒し群において有意に低かった。肝臓 TG 濃度および血清 Chol 濃度に関しては群間で差はみられなかったが、肝臓 PL 濃度は CO 群と比べ 6 回水晒し群において有意に低値を示した。肝臓脂肪合成酵素活性は CO 群と比較してマアジ群、1 回および 6 回水晒し群において低い傾向にあった。糞中酸性ステロイド排泄量は CO 群と比較してマアジ群において高値であったが、総ステロイド排泄量に群間での差は認められなかった。以上の結果より、水晒ししたマアジはマアジ落とし身と同程度の脂質代謝改善作用を示し、水晒しの回数の違いによる機能性の違いはそれほど大きくなかった。すり身素材として水晒ししたマアジが脂質代謝改善作用を発揮する可能性が示唆された。

lipid metabolism, fish cake, water-leach

講演番号：2A08p03
講演日時：3 月 18 日 14:30～ A 校舎 08 会場

緑茶葉とビワ葉を混合揉捻して製造した発酵茶葉粉末長期摂取がヒトの体脂肪に及ぼす影響
Effects of fermented tea leaves made by tea-rolling processing of green tea leaves and loquat leaves on body fat mass in humans

○田中 一成[1]、土橋 葵[1]、原口 翼[1]、水田 成美[1]、青木 啓武[1]、武山 藍[1]、野中 知夏[1]、宮田 裕次[2]、吉野 豊[3]、小森 美加[4]、山村 春男[5] ([1]長崎県大・栄養健康、[2]長崎県農林技セ、[3]サンダイ、[4]ケイ・エス・オー、[5]シャルレ)
○ Kazunari TANAKA[1], Aoi TSUCHIHASHI[1], Tsubasa HARAGUCHI[1], Narumi MIZUTA[1], Hiromu AOKI[1], Ai TAKEYAMA[1], Chika NONAKA[1], Yuji MIYATA[2], Yutaka YOSHINO[3], Mika KOMORI[4], Haruo YAMAMURA[5] ([1]Univ. Nagasaki, [2]Nagasaki Pref. Agric. Fores. Exp. Stat., [3]Sandai, [4]KSO, [5]Sharle)

【目的】夏場に摘採される緑茶葉は、カテキン含量が高く苦味が強いために商品価値が低く、必ずしも有効に利用されていない。長崎県特産のビワ葉も多く利用されていないが、ビワ葉にはカテキンの酸化重合を促進する成分や酵素が含まれている。演者らは緑茶葉とビワ葉を混合揉捻して茶葉に含まれるカテキンの酸化を促進することで発酵茶葉を生成する新たな茶の製造法を開発した。この発酵茶は、ラットにおいて脂質濃度低下作用、体脂肪減少作用を発揮することを繰り返し観察してきた。本研究では、ビワ葉混合発酵茶葉粉末長期摂取がヒトの体脂肪に及ぼす影響を検討した。
【方法】(実験 1) 大学 3 年生から大学院 2 年生までの女子学生 29 名（平均年齢 20.9 歳）を被験者とした。試験はランダム化二重盲検プラセボ対照平行群間比較法で実施した。ビワ葉混合発酵茶葉粉末 1.2g を含む分包（試験食品）と茶葉を含まない粉末分包（プラセボ）を被験食品とした。被験食品 1 包を 1 日の食事のいずれかの直前に水あるいは湯に溶かして 12 週間摂取させた。摂取開始直前、4 週後、8 週後、12 週後および摂取終了 4 週（後観察期間）後に、内臓脂肪面積、体重、体脂肪率、BMI、ウエスト長、血圧を測定した。(実験 2) スクリーニングにより内臓脂肪面積が 80 ㎠以上の男女 22 名（男性 3 名、女性 19 名、平均年齢 47.2 歳）を被験者とした。試験は実験 1 と同じ試験食品のみを摂取するオープン法により実施した。試験食品の摂取方法は実験 1 と同様である。試験期間は 8 週間とし、測定項目は実験 1 の項目以外に採血による血液成分の分析も行った。なお本研究は、「ヘルシンキ宣言」および「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」の精神に則り、被験者の人権保護に配慮し、倫理委員会等の承認を得て実施した。
【結果および考察】(実験 1) 内臓脂肪面積は試験食品摂取で減少する傾向を示し、8 週後にプラセボ摂取より有意に低値であった。12 週後の値には両群間で差はなく、摂取終了 4 週後の値は同じであった。ウエスト長は試験食摂取で 12 週後にプラセボ摂取より低い傾向であった。(実験 2) 試験食品摂取は 8 週後に内臓脂肪面積を試験開始時より有意に低下させた。また、BMI 値も 8 週後に開始時より低値を示した。総コレステロールおよび LDL-コレステロール濃度は摂取 4 週後に試験食品摂取で低下した。また、HbA1c は 4 週以降有意に低下した。AST および ALT には試験食品摂取による影響は認められなかった。これらの結果から、ビワ葉混合発酵茶葉粉末長期摂取は健常な若年女性および内臓脂肪面積の多いヒトにおいて内臓脂肪面積を低下させる作用を発現することが明らかとなった。

fermented tea, body fat, loquat

発表責任者：田中一成（katanaka@sun.ac.jp）

講演番号：2A08p04
講演日時：3 月 18 日 14:45～ A 校舎 08 会場

必須脂肪酸欠乏食による脂肪肝形成機構の検討
Mechanisms of hepatic steatosis induced by essential fatty acid deficient diet
○中嶌 岳郎[1]、盧 郁[1]、中村 浩蔵[2]、小山 正浩[2]、杉山 英子[3]、上條 祐司[1]、田中 直樹[1]、青山 俊文[1] ([1]信大医、[2]信大農、[3]長野県短大)
○Takero NAKAJIMA[1], Yu LU[1], Kozo NAKAMURA[2], Masahiro KOYAMA[2], Eiko SUGIYAMA[3], Yuji KAMIJO[1], Naoki TANAKA[1], Toshifumi AOYAMA[1] ([1]Shinshu Univ Med, [2]Shinshu Univ Agr, [3]Nagano Pref Coll)

一部の多価不飽和脂肪酸はヒトや哺乳動物にとって必須の栄養素であり、必須脂肪酸と呼ばれる。必須脂肪酸を含まない食餌でマウスやラットを飼育すると脂肪肝を生じることが古くから知られているが、そのメカニズムは十分に解明されていない。本研究では、必須脂肪酸欠乏食として硬化ヤシ油含有食（HCO 食）を用いてマウスを 5 および 10 週間飼育し、脂肪肝形成のメカニズムを検討した。

HCO 食負荷によるマウス肝臓へのトリグリセリド蓄積は、負荷 5 週で著しく増加し、負荷 10 週ではさらに増加した。また、負荷 10 週では肝臓の遊離脂肪酸含量の著増もみられた。肝臓の組織学的解析から、門脈域周辺部に大小の脂肪滴の蓄積が確認された。肝臓ミトコンドリアの脂肪酸β酸化を担う主要酵素のうち、4 種（LACS, CPT-I, LCAD, TPβ）の発現量は HCO 食負荷 10 週で増加していた。一方、ミトコンドリア内への脂肪酸輸送・活性化に必須であるカルニチンパルミトイル転移酵素（CPT）-II の発現量は、HCO 食負荷 5 週で半減しており、負荷 10 週でも同レベルの発現減少が生じていた。また、肝細胞への脂肪酸流入を促進する脂肪酸輸送蛋白 2 種（FAT, L-FABP）、および、脂肪組織での脂肪分解を促進する肝由来因子（FGF-21）の発現量は、HCO 食負荷 5 および 10 週で共に増加していた。加えて、HCO 食負荷 10 週では、肝臓トリグリセリド合成の律速酵素（DGAT2）の発現増加もみられた。一方、脂肪酸デノボ合成系の主要酵素 2 種（ACC1, FAS）の発現量に顕著な変化はみられなかった。

以上から、HCO 食負荷マウスの肝臓では、負荷 5 週までに、CPT-II 発現低下に伴うミトコンドリアへの脂肪酸輸送阻害が生じ、これにより脂肪酸分解量が減少すると共に、肝細胞への脂肪酸流入量の増加が生じる結果、肝臓へのトリグリセリド蓄積が促進した可能性が考えられた。そして、これらの現象が続いた結果、負荷 10 週においてさらに顕著な脂肪肝を生じたと考えられた。また、負荷 10 週では肝臓への遊離脂肪酸蓄積も顕著に生じており、この作用によりいくつかの脂肪酸分解系酵素の誘導が生じたと思われた。

essential fatty acid deficiency, fatty liver

発表責任者：中嶌岳郎（nakat@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2A08p05
講演日時：3 月 18 日 15:00～ A 校舎 08 会場

# 低アルギニン食による肝脂肪蓄積機構の解析

# Study on the mechanism of liver fat accumulation by low arginine diet

○赤坂 優太[1]、大谷 りら[1]、賈 慧娟[1]、菅原 正義[2]、加藤 久典[1]([1]東大・食と生命、[2]長岡高専)
○Yuta AKASAKA[1], Lila OHTANI[1], Huijuan JIA[1], Masayoshi SUGAWARA[2], Hisanori KATO[1]
([1]Tokyo Univ., [2]NCT, Nagaoka)

【目的】我々は、若齢ラットに低アルギニン食を給餌すると、肝臓への中性脂肪（TG）の蓄積が増加することを報告してきた。その作用機序として、肝臓からの脂質放出抑制が示唆されている。また、低アルギニン食を 5 時間給餌した際に血中オロト酸濃度が顕著に上昇することなどから、低アルギニン食による脂肪肝誘導とオロト酸添加食による脂肪肝誘導との間に関連がある可能性を報告してきた。そこで本研究では、低アルギニン食による肝臓への TG 蓄積の機構をより詳細に検討することを目的とし、オロト酸添加食にも低アルギニン食と同様に脂質放出抑制の効果があるかを検討した。
【方法】①6 週齢の雄性 Wistar ラットにアルギニンのみを対照群の 3 分の 1 になるよう調製した飼料（低アルギニン食）を 2 週間与えた。なお、対照群には 15%カゼインと類似した組成のアミノ酸ミックスを用いた。他の組成は AIN76 に準じて調製した。給餌開始から 15 日目に 5 時間絶食ののち解剖を行い、肝臓、腎臓、血液を採取した。肝臓における脂肪酸合成に関わる遺伝子(Pklr、Fas、Acc)の発現量、および酵素活性をそれぞれ測定した。また、VLDL 形成に関与する遺伝子（ApoA4）の発現量とタンパク質量を測定した。②明期に摂食させるために制限給餌による馴化を行った後、7.5 週齢の雄性 Wistar ラットに低アルギニン食および 1%オロト酸添加食を 5 時間与えた。直ちにイソフルラン麻酔下尾静脈より採血を行った後、同じく尾静脈よりリポプロテインリパーゼの阻害剤である Tyloxapol を 0.2mg / g BW になるよう投与した。Tyloxapol 投与後 0.5、1、2、4 時間後に尾静脈より採血を行った。血漿中の TG、総コレステロール、HDL コレステロールおよび遊離脂肪酸濃度を測定した。
【結果】①低アルギニン食給餌 15 日目の時点で肝臓に有意な脂肪蓄積が認められた。また、血漿中の TG 濃度は有意に減少した。さらに、ApoA4 の遺伝子発現量は有意に低下していた。これより、低アルギニン食は給餌 15 日目においても肝臓からの脂質放出を抑制し、血漿 TG 濃度を下げる働きをすることを確認した。脂肪酸合成の主要因子の遺伝子発現量に有意差は認められなかったが、Fas の酵素活性に有意な抑制が認められた。②低アルギニン食、オロト酸添加食いずれにおいても血漿 TG 濃度の上昇は抑制された。このことから、低アルギニン食、オロト酸添加食ともに脂質放出抑制の効果がある可能性が示唆された。
本研究は農林水産省「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」を活用して行った。

arginine, fatty liver, orotic acid

講演番号：2A08p06
講演日時：3 月 18 日 15:25～ A 校舎 08 会場

調理加工が大豆食品の脂質代謝調節機能に及ぼす影響：スターチ食とスクロース食における比較
Effect of differently processed soy foods on lipid metabolism: In a comparison of the starch-base diet with the sucrose-base diets
○高橋 陽子、八巻 幸二（農研機構食品研）
○Yoko TAKAHASHI, Kohji YAMAKI (NFRI)

【目的】大豆は日本人の食生活と深く関わり、さまざまな加工食品として利用されている。大豆には脂質代謝改善作用を示す成分が含まれ、大豆食品も脂質代謝改善に寄与すると考えられているが、食品の調理加工によるその機能性の変化については知られていない。一方、日本人の食生活における炭水化物源は、かつては米などの穀物由来の多糖類が中心であったが、清涼飲料水や菓子に含まれる砂糖などの二糖類・単糖類の摂取が増加してきた。本研究では、食餌の炭水化物源は大豆の脂質代謝調節作用に影響するか、また、調理加工は大豆食品の機能性に影響するかを実験動物レベルで検討した。
【方法】同じ原料大豆から煎り大豆、大豆飲料、蒸し大豆を製造し、それぞれ凍結乾燥後、粉砕した。実験は、飼料はコーンスターチまたはスクロース主体の基礎食で 2 組に分けて実施した。各実験とも、大豆食品を含まないカゼイン群、各大豆食品を 300g/kg を含む群の 4 群ずつとし、雄性 SD 系ラットにいずれかの飼料を自由摂取させ、21 日間飼育した。解剖 3 日前から糞便を回収し、その後、血清、肝臓の脂質代謝に関連するパラメータを測定し、食餌群間の違いを解析した。
【結果】大豆食品は廃棄部分を最小限にする製造方法を採ったため、凍結乾燥した状態で測定した栄養成分組成は大きな違いは見られなかった。血清中性脂肪濃度は、スターチ食ではカゼイン群、煎り大豆群と比べ大豆飲料群で有意に低下したのに対し、スクロース食では煎り大豆群より蒸し大豆群で低下した。血清遊離脂肪酸濃度はスクロース食と比べスターチ食で全般的に低かったが、大豆食品では蒸し大豆による低下作用が比較的大きかった。血清コレステロール濃度は、スクロース食において大豆食品摂取により有意に低下したが、食品間の低下量に差は見られなかった。一方、肝臓の中性脂肪およびコレステロール濃度には群間の有意差はなかった。肝臓での脂肪酸合成系酵素の活性や mRNA 発現量は、スターチ食、スクロース食とも大豆食品はそれぞれ有意にかつ同程度低下していた。
【結論】本研究で使用した大豆食品は、カゼイン食と比べていずれも脂質代謝を改善する作用が示された。スターチ食とスクロース食の間で食品に対する応答で違いが見られたパラメータはあったが、大豆食品の作用は全般的に両実験間での差は小さかった。製造方法に由来するタンパク質成分等の物理的な変性は、大豆食品の脂質代謝改善作用にあまり影響しないと考えられた。

soy foods, carbohydrate, lipid metabolism

講演番号：2A08p07
講演日時：3 月 18 日 15:40～ A 校舎 08 会場

# イソマルトデキストリンの血中中性脂肪上昇抑制作用

# Suppressive effect of isomaltodextrin on postprandial blood triacylglycerol elevation in rats.

○高柿 了大、谷口 美文、櫻井 岳夫、渡辺 光、三鼓 仁志、牛尾 慎平、福田 恵温 ((株)林原 研究開発本部)
○Ryodai Takagaki, Yoshifumi Taniguchi, Takeo Sakurai, Hikaru Watanabe, Hitoshi Mitsuzumi, Shimpei Ushio, Shigeharu Fukuda (HAYASHIBARA CO.,LTD.,R&D Center)

【目的】
イソマルトデキストリン（IMD）は、*Paenibacillus* 属細菌由来の酵素を澱粉に作用させることによって製造される水溶性食物繊維の一種である。食物繊維は一般的に食後の血中脂質上昇を抑制することが知られているため、IMD にも同様の作用が期待される。そこで、我々はラット脂質負荷試験を行い、IMD が脂質の消化吸収におよぼす影響について検討した。
【方法】
1) Wistar ラット（雄、7 週齢）を予備飼育後、3 群（各 6 匹）に群分けした。試験は 16 時間絶食後、イントラリポス輸液(脂質終濃度:1.5g/kg-bw)に①水(対照群)、②IMD 水溶液（終濃度:0.2g/kg-bw)、③IMD 水溶液(終濃度:1.0g/kg-bw)をそれぞれ混和し、強制経口投与した。投与前および投与 1,2,3,4,6 時間後に尾静脈より採血し、血中中性脂肪（TG）含量を測定した。
2) Kondo らの方法 [1]に従い IMD が脂質と胆汁酸の乳化に与える影響について検討を行った。次に、Shishikura らの方法 [2]に従いリパーゼ活性の阻害作用を確認するために脂質ミセルからの脂肪酸遊離量の検討を行った。最後に、Kishimoto らの方法 [3]に従い脂肪酸ミセルの形態に与える影響について検討を行った。
【結果と考察】
1) IMD は濃度に依存して、血中 TG の上昇を抑制した。また水対照群と比較して、IMD(1.0g/kg-bw)群では投与 1、2 時間後の TG 値が有意に低下した。また、曲線下面積では IMD 二群ともに水対照群に対して有意な低下が認められた。
2) IMD は乳化およびリパーゼ活性に影響を与えなかった。一方、脂肪酸ミセルの崩壊を抑制し、粒子径を大きく保つ作用が確認された。
以上のことから、IMD は脂質負荷後のラットにおいて血中中性脂肪の上昇を抑制することがわかった。その作用メカニズムとして、IMD は脂質の吸収過程におけるミセル崩壊を抑制し、脂肪酸の遊離を遅らせることが一因であると考えられた。

[1]S. Kondo et al.J Jpn Soc Nutr Food Sci.,60,105-110 (2007)
[2]Y. Shishikura et al.Biosci.Biotechnol.Biochem.,76,2329-2331 (2012)
[3]Y. Kishimoto et al.Jounal of Health Science., 55(5),838-844 (2009)

Isomaltodextrin, Lipid absorption

講演番号：2A08p08
講演日時：3 月 18 日 15:55～ A 校舎 08 会場

麹抽出物の脂質代謝改善作用に関する研究
Effect of Rice Koji Extract on Lipid Metabolism
○高橋 春弥[1]、紀 欣儀[1]、毛利 晋輔[1]、鎌苅 浩介[1]、中田 啓司[2]、一條 範好[2]、中田 理恵子[3]、井上 裕康[3]、後藤 剛[1,4]、河田 照雄[1,4]([1]京大院農・食品生物、[2]マルコメ(株)、[3]奈良女子大・生活環境科学、[4]京大・生理化学研究ユニット)
○ Haruya TAKAHASHI[1], Hsin-Yi CHI[1], Shinsuke MOHRI[1], Kosuke KAMAKARI[1], Keiji NAKATA[2], Noriyoshi ICHIJO[2], Rieko NAKATA[3], Hiroyasu INOUE[3], Tsuyoshi GOTO[1,4], Teruo KAWADA[1,4] ([1]Div. Food Sci. Biotechnol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Marukome Co., Ltd., [3]Nutr. and Food Sci., Nara Women's Univ., [4]Res. Unit Physiol. Chem., Kyoto Univ.)

**【目的】**ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (PPAR) α の活性化は、脂肪酸酸化を促すことが知られているため、PPARα 活性化は脂質代謝異常が主因である生活習慣病の予防・改善につながると期待される。また、食品由来の PPARα 活性化成分の探索は、普段の食生活から生活習慣病を予防・改善する観点から重要である。麹は日本の伝統食を支える醤油や味噌に必要不可欠な存在である。近年の研究により麹が脂質代謝促進作用を有していることが報告されているが、その詳細な作用機序については不明確な点が多い。本研究では PPARα を活性化する麹抽出物由来機能性成分を探索・同定し、同定した成分について、肝臓における脂質代謝に与える効果を中心に検討することを目的とした。
**【方法】**高脂肪食条件下で麹エタノール抽出物 (RKE) を肥満糖尿病モデルマウスに 37 日間飲水投与させ、体重・血糖値・血中中性脂肪値の測定を行った。肝臓については中性脂肪含有量及び PPARα 標的遺伝子発現量の測定を行った。また、RKE をシリカゲルオープンカラム及び逆相 HPLC を用いて分画し、ルシフェラーゼレポーターアッセイにより PPARα 活性化能を評価し、得られた活性画分中に含まれる成分を LC-MS を用いて同定した。さらに、野生型 (WT) 及び PPARα 欠損型 (KO) マウス肝臓初代培養細胞系を用いて、RKE 及び LC-MS で同定した成分を添加し、中性脂肪蓄積量及び PPARα 標的遺伝子発現量の測定を行った。
**【結果及び考察】**肥満糖尿病モデルマウスに対する RKE 投与実験の結果、Control 群と比較し、RKE 投与群では体重増加が抑制され、血中中性脂肪値及び血糖値が有意に減少した。また、RKE 投与群では肝臓中中性脂肪含有量の減少及び PPARα 標的遺伝子発現量の増加が認められた。RKE をシリカゲルオープンカラムにて 6 画分に分離し、この内、2 つの画分が高い PPARα 活性化能を示した。この 2 画分についてさらに HPLC により分画し、3 種の活性画分を得た。これらの画分に含まれる成分を分析したところ、リノール酸、オレイン酸、Hydroxy-octadecadienoic acids (HODEs) であることが判明し、これらの中で、9-(*E,E*)-HODE が最も PPARα 活性化能が強いことが見出された。この成分及び RKE の機能について、WT マウス肝臓初代培養細胞系で検討を行ったところ、9-(*E,E*)-HODE あるいは RKE 添加により、中性脂肪蓄積量が減少し、PPARα の制御下にある脂質代謝関連遺伝子発現量が増加した。さらに、これらの効果は、KO マウスでの肝臓初代培養細胞系では消失することを見出した。以上のことから、麹は 9-(*E,E*)-HODE 等の PPARα 活性化成分を介し、肝臓における脂質代謝亢進に寄与することが示唆された。

PPARα, Lipid Metabolism, LC-MS

講演番号：2A08p09
講演日時：3 月 18 日 16:10～ A 校舎 08 会場

# 高脂肪食負荷ラットにおけるアルギン酸カルシウムの脂肪低下作用の検討

# Effect of calcium alginate on fat in rats fed high fat diet

○斉藤 早知[1]、井戸田 陽子[2]、加藤 多佳子[2]、横山 朱里[2]、矢野 健太郎[2]、柿沼 千早[2]、宮島 千尋[1]、笠原 文善[1]、荻原 琢男[3] ([1]株式会社キミカ、[2]高崎健康福祉大学　薬学部、[3]高崎健康福祉大学大学院　薬学研究科)

○Sachi SAITO[1], Yoko IDOTA[2], Takako KATO[2], Akari YOKOYAMA[2], Kentaro YANO[2], Chihaya KAKINUMA[2], Chihiro MIYAJIMA[1], Fumiyoshi KASAHARA[1], Takuo OGIHARA[3] ([1]KIMICA corporation, [2]Faculty of Pharmacy, Takasaki University of Health and Welfare, [3]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Takasaki University of Health and Welfare)

【背景・目的】

アルギン酸（Alginic acid：Alg）は天然の海藻に含まれる多糖類であり、食品添加物，健康食品及び医薬品原料として使用されている。アルギン酸の塩類であるアルギン酸カルシウム（Ca-Alg）は血中コレステロール（Cho）低下作用を有することがすでに報告されている [1)]。本検討では、高脂肪食を負荷したラットを用いて Ca-Alg が血中トリグリセリド（TG）値及び体脂肪重量に与える影響について検討した。

【方法】

SD 系雄性ラット（4 週齢）に、高脂肪飼料（通常飼料にラード 14%を配合した飼料：Control 群），高脂肪飼料に種々の比率で Ca-Alg を加えた飼料（Ca-Alg 配合群），高脂肪飼料に難消化性デキストリン（RMD）を加えた飼料をそれぞれ 5 週間与え、経時的に体重，体脂肪及び血中 TG 値を測定した。体脂肪測定には体脂肪計を使用し、5 週間後には脂肪及び主要臓器を摘出して病理所見を取得した。さらに、脂肪量，その他血中生理学的パラメータ，門脈血中胆汁酸濃度，糞便量，糞便中 TG 濃度及び糞便中胆汁酸濃度を測定した。

【結果・考察】

Ca-Alg 配合群では Control 群と比較し、用量依存的に体重及び体脂肪量の増加抑制がみられ、特に精巣上体脂肪及び後腹膜脂肪において有意な脂肪増加抑制効果が認められた。また、Ca-Alg 配合群において血中 TG 値の上昇が有意に抑制され、糞便量及び糞便中 TG 排泄量の有意な増加が観察された。さらに、病理所見より Control 群では肝臓に TG 蓄積と考えられる小胞が確認されたが、Ca-Alg 配合群ではその小胞が減少した。生理学的パラメータではいくつかの変化が観察されたが、生理的範囲内に留まり、安全性の評価に問題はないと考えられた。

以上の結果より、Ca-Alg による体重，血中 TG 値及び体脂肪量の増加抑制作用、TG の糞中排泄促進作用が示された。Ca-Alg は食品添加物としての安全性がすでに確立されていることから、長期服用可能であると考えられ、また、RMD と同等以上の効果が得られており、既存の対抗素材としても期待されるものと考えられた。

1) Idota Y, Kogure Y, Kato T, Ogawa M, Kobayashi S, Kakinuma C, Yano K, Arakawa H, Miyajima C, Kasahara F, Ogihara T. Cholesterol-Lowering Effect of Calcium Alginate in Rats. *Biol. Pharm. Bull.*, **39**, 62-67 (2016)

alginate, triacylglycerol(triglyceride), lipid(fat)

発表責任者：斉藤早知（saito-sachi@kimica.jp）

講演番号：2A08p10
講演日時：3 月 18 日 16:25～ A 校舎 08 会場

# 自然発症 2 型糖尿病モデル動物を低温環境に曝露した際の脂肪組織エネルギー代謝関連遺伝子の発現変動

# Effects of cold exposure on energy metabolism-related genes expressions in type 2 diabetes mellitus model rats

○出口 美輪子[1]、生谷 美紗都[1]、仲 朋美[1]、細田 明美[2]、山岸 あづみ[3]、海老原 伸[1]、金 東浩[1]、佐伯 茂[1] ([1]大阪市大・院生活科学、[2]東京医療保健大・医療栄養、[3]山形大・地域教育)
○ Miwako DEGUCHI[1], Misato IKUTANI[1], Tomomi NAKA[1], Akemi HOSODA[2], Azumi YAMAGISHI[3], Shin EBIHARA[1], Dong-Ho KIM[1], Shigeru SAEKI[1] ([1]Osaka City Univ., [2]Tokyo Health Care Univ., [3]Yamagata Univ.)

【目的】肥満は，限られた先進国の疾患であったが，現在では，発展途上国においても，ライフスタイルや食習慣の急速な変化によって，肥満が深刻な社会問題となっている。肥満は，エネルギー蓄積とエネルギー消費のアンバランスによって引き起こされる。ヒトを含む哺乳類には，機能が異なる 2 種類の脂肪組織，即ち，白色脂肪組織と褐色脂肪組織が存在する。多量の脂肪滴を蓄える白色脂肪組織は, エネルギー貯蔵器官として機能する。一方, 多量のミトコンドリアを含有する褐色脂肪組織は, そのミトコンドリア内膜に脱共役タンパク質(UCP1)が高発現し，β3 アドレナリン受容体(β3AR)を介してエネルギー消費器官として機能する。従来，褐色脂肪組織は，新生児や幼児でのみ存在し，成人では殆ど存在しないと考えられていた。しかし近年，成人にも充分量の褐色脂肪組織が存在することが明らかとなり，エネルギー代謝に果たす褐色脂肪組織の役割に注目が集まっている。Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty(OLETF)ラットは，自然発症的に肥満や 2 型糖尿病を発症することが知られている。本研究は，肥満の発症機構を明らかにすることを目的に，褐色脂肪組織のエネルギー代謝関連遺伝子の発現量に対する寒冷曝露の影響を，OLETF ラットと正常系統 Long-Evans Tokushima Otsuka(LETO)ラットとで比較検討した。
【結果・考察】褐色脂肪組織の UCP1 遺伝子発現量は，室温環境下では LETO ラットに比べ OLETF ラットで有意に低かったが，寒冷環境下では LETO ラット，OLETF ラット共に有意に上昇した。褐色脂肪組織のβ3AR 遺伝子の発現量は，室温環境下では LETO ラットと OLETF ラットで有意差が無かったが, 寒冷環境下では LETO ラットでのみ有意に上昇した。以上の実験結果より, OLETF ラットでは，UCP1 の活性化に関与するβ3AR の機能が低下していることが，肥満の発症原因の 1 つと考えられた。

type 2 diabetes mellitus, adipose tissue, obesity

講演番号：2A08p11
講演日時：3 月 18 日 16:50～ A 校舎 08 会場

# 分枝鎖アミノ酸摂食がラットの奇数直鎖脂肪酸および分枝鎖脂肪酸代謝に及ぼす影響

# Effects of Dietary Branched-chain Amino Acids on the Metabolism of Odd-numbered-straight-chain Fatty Acids and Branched-chain Fatty Acids in Rats

○林 拓也、城内 文吾、佐藤 匡央 (九大農)
○Takuya HAYASHI, Bungo SHIROUCHI, Masao SATO (Kyushu Univ.)

【目的】

脂肪酸は，生体膜の構成要素またはエネルギー貯蔵の一形態として様々な形で生体内に存在する．生体中のほとんどの脂肪酸は，炭素原子が直鎖状に偶数個結合している．奇数個の直鎖炭素鎖を有する奇数直鎖脂肪酸（ONSFA）やメチル基の分枝を有する分枝鎖脂肪酸（BCFA）は，生体内に微量に存在し，これらの血中濃度は種々の疾病と強く関連していることが報告されている．したがって，これら微量脂肪酸の代謝機構の解明は疾病の原因および状態を考察する上で重要といえる．

ONSFA および BCFA の生合成は，分枝鎖アミノ酸（BCAA）異化中間物質から生合成されることが知られているが，*in vivo* において BCAA 摂食が微量脂肪酸の代謝に及ぼす影響を評価した報告はない．そこで,本研究はラットに BCAA を添加摂食させたときの微量脂肪酸代謝を評価することを目的とした．

【方法】

4 週齢雄性 SD 系ラットを 1 週間予備飼育後，AIN-76 組成に準じ 0.2%のコレステロールを添加した Control 食，もしくは，Control 食に含まれるカゼイン 20% のうち 3% を BCAA に置換した BCAA 添加食を 3 週間与えた．なお BCAA は Leu ： Ile ： Val = 2.0 ： 1.0 ： 1.2 の比で混合した．屠殺後，種々の臓器および血液を回収した．各臓器および血清中の脂肪酸濃度を GC/FID により定量し，水溶性代謝物濃度を GC/MS により半定量した．

【結果・考察】

BCAA 添加食の摂食により，肝臓ホスファチジルコリン，ホスファチジルエタノールアミン画分中の ONSFA 濃度が有意に低下した．また，血清コレステロールエステル画分中の ONSFA 濃度および血清ホスファチジルコリン画分中の BCFA 濃度が有意に上昇した. BCAA 添加食の摂食により BCAA 異化物質であるコハク酸濃度が骨格筋中で有意に上昇したことから，肝外組織で BCAA が代謝を受けることで ONSFA および BCFA 合成が亢進し,それが血中の微量脂肪酸濃度上昇に寄与していることが考えられる．現在，更なる解析により BCAA 摂食時の ONSFA および BCFA 合成に寄与する主要な肝外組織を探索中である．

また，BCAA 添加食の摂食により肝臓チミジン濃度が有意に低下した．チミジン合成に関わる葉酸回路および BCAA 代謝に関わるメチルマロニル CoA ムターゼは共にコバラミンを要求する．BCAA 高負荷は，コバラミンを介して肝臓 DNA 合成と肝外組織の微量脂肪酸合成に影響する可能性が示された．

fatty acids, branched-chain amino acids, metabolomics

発表責任者：林　拓也（iringkun@gmail.com）

講演番号：2A08p12
講演日時：3 月 18 日 17:05～ A 校舎 08 会場

# 中鎖脂肪酸・ケトン食による代謝機能改善メカニズムの分子レベルでの解明

# Molecular mechanism of metabolic improvement by medium chain fatty acids and ketogenic diet.

○粕渕 真由[1]、渡辺 啓太[1]、宮本 潤基[1]、中島 啓[1]、國澤 純[2]、木村 郁夫[1] ([1]東農工大農、[2]医薬基盤・健康・栄養研究所)
○Mayu KASUBUCHI[1], Keita WATANABE[1], Junki MIYAMOTO[1], Akira NAKAJIMA[1], Jun KUNISAWA[2], Ikuo KIMURA[1] ([1]Tokyo University of Agriculture and Technology, [2]National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition)

【背景・目的】ケトン体は、飢餓や糖尿病など体内での糖利用が困難な際にグルコースの代替エネルギーとして肝臓で産生される。また、ココナッツオイルの機能性主成分とされる中鎖脂肪酸は、速やかに肝臓に輸送・分解され、エネルギー源としてケトン体を産生することが知られている。近年、中鎖脂肪酸・ケトン食により生体内でケトン体合成を誘導することで、代謝機能を改善する食事療法が注目されている。しかしながら、その分子レベルの作用メカニズムの詳細は未だ不明のままである。我々は現在までに、ケトン体の一種であるβ-ヒドロキシ酪酸が短鎖脂肪酸受容体 GPR41 のリガンドとして作用することを見出し、GPR41 がケトジェニック環境下でエネルギー代謝を制御し得ることを明らかにした(Kimura et al., PNAS.)。そこで、もう一つの短鎖脂肪酸受容体である GPR43 も同様に各種モノカルボン酸により活性化されることから、GPR43 がケトン体の受容体になり得る可能性について独自に着目した。さらには中鎖脂肪酸受容体 GPR84 を介した直接的な中鎖脂肪酸による効果や、ケトン体であるβ-ヒドロキシ酪酸の受容体として知られている GPR109a についても焦点を当て、ケトン体が生体エネルギー代謝機能に及ぼす影響についての統合的理解を目指し研究を進めている。
【方法】各種脂肪酸受容体強制発現細胞株を用いて、ケトン体を含めたモノカルボン酸のスクリーニング評価および、GPCR 下流シグナル解析を行った。また、短鎖脂肪酸受容体 GPR41 や GPR43 遺伝子欠損マウス、ケトン体受容体 GPR109a、中鎖脂肪酸受容体 GPR84 遺伝子欠損マウスを用いて、ケトジェニック環境下におけるケトン体と各種脂肪酸受容体の影響を検討した。
【結果・考察】モノカルボン酸のスクリーニング評価および下流シグナル解析の結果、ケトン体が GPR43 のアゴニストとして作用することが明らかとなった。またケトジェニック環境下において、野生型で観察されたケトン体による脂質代謝への影響が、各種脂肪酸受容体遺伝子改変マウスでは異なった変化としてみられたことから、ケトン体が各種脂肪酸受容体を介して宿主の脂質代謝に寄与する可能性が示唆された。以上より、各種脂肪酸受容体は脂肪酸とケトン体を認識することで栄養状態を感知し、それぞれ異なるシグナル経路を介して生体のエネルギー代謝に影響を及ぼす可能性が示唆された。今後のより詳細な各種脂肪酸受容体とケトン体の相互作用の解析が、中鎖脂肪酸・ケトン食による新たなエネルギー代謝調節機構の統合的理解に繋がると考えられる。

Medium chain fatty acids, Ketone body, GPCR

発表責任者：木村郁夫（ikimura@cc.tuat.ac.jp）

講演番号：2A08p13
講演日時：3 月 18 日 17:20～ A 校舎 08 会場

肥満誘導慢性炎症モデルマウスにおける乳脂肪球皮膜摂取の影響
Effect of milk fat globule membrane intake on obese induced chronic inflammation model mice.
○廣瀬 彰人[1]、山田 潔[1]、蕪山 由己人[1]、元島 英雅[2]、東 徳洋[1]([1]宇大農、[2]よつ葉乳業（株））
○AKITO HIROSE[1], KIYOSI YAMADA[1], YUKIHITO KABUYAMA[1], HIDEMASA MOTOSIMA[2], NORIHIRO AZUMA[1] ([1]Utsunomiya Univ., [2]Yotsuba Milk Products Co.,Ltd)

【目的】内臓脂肪蓄積を伴う肥満症の特徴として脂肪組織でマクロファージの浸潤による慢性炎症が生じており、これが糖尿病や高血圧、高脂血症、動脈硬化、心疾患などのリスクの因子であるとされている。本研究では、このメタボリックシンドロームを抑える食品候補としてバター製造過程で排除される乳脂肪球皮膜（MFGM）に着目した。これまでに *in vitro* で MFGM が脂肪の取り込み、蓄積の抑制効果を示す結果を、*in vivo* で内臓脂肪蓄積を抑制する結果を得ており、今回は MFGM 摂取による肥満モデルマウスにおける慢性炎症抑制効果の検討を行った。

【方法】雄の C57BL/6J マウス 4 週齢を用いて、4 ヶ月間高脂肪食（D12451）を与え、肥満由来慢性炎症モデルマウスの作製を行った。作製した慢性炎症モデルマウスを 2 群に分け、1 群を高脂肪食群（HF 群）、2 群を高脂肪食群+MFGM 群（MFGM 群）として 2 ヶ月間飼育を行った。飼育中体重および摂食量を測定し、飼育終了時に解剖を行い、体重推移の変化、各種血清成分濃度変化、各脂肪重量の測定、リアルタイム PCR による脂肪細胞中の炎症性サイトカイン遺伝子発現の定量などを行い、肥満由来の慢性炎症に対する抑制効果の検討を行った。

【結果】HF 群と比較して MFGM 群において有意な体重の変化は認められなかった（P=0.418）が、内臓脂肪組織重量の有意な減少（P=0.004）が認められた。内臓脂肪における遺伝子発現量において、炎症性サイトカイン TNFα の有意な減少（P=0.027）が認められた。血清分析においてもインスリン抵抗性の指標となるグルコース濃度の減少傾向（P=0.058）が認められ、遊離脂肪酸濃度（FFA）において有意な減少（P=0.019）が認められた。

【考察】肥満の脂肪細胞にはマクロファージの浸潤が増加することで、TNFα と FFA に代表される液性因子を介した相互作用の悪循環を形成して、アディポサイトカイン産生調節破綻が招来されると考えられる。MFGM に含まれる脂肪の分泌・運搬に関与する成分やスカベンジャー受容体 CD36 などの働きで、内臓脂肪の蓄積及び悪循環を断ち切った、もしくは影響を与えたことにより、TNFα の産出量が HF 群に比べて少なかったことが考えられる。またその影響で、FFA の産出も抑制され、血中 FFA の濃度が減少し、インスリン抵抗性が緩和され、血中のグルコース濃度が HF 群と比較して低かったことが考えられる。この慢性炎症抑制のメカニズムのさらなる解明のため、現在脂肪細胞中の他の炎症性サイトカイン遺伝子発現の定量や血清成分分析など行っている最中である。

milk fat globule membrane, chronic inflammation, lipid metabolism

発表責任者：廣瀬 彰人（ma158129@gmail.com）

講演番号：2A08p14
講演日時：3 月 18 日 17:35～ A 校舎 08 会場

卵巣摘出ラットにおける共役リノール酸と糖転移ヘスペリジンの脂質代謝異常予防効果
Preventive effect of conjugated linoleic acid and glucosyl hesperidin on ovariectomy-induced dyslipidemia in female rats

○小栗 幹也[1]、谷澤 郁[1]、鈴木 那菜[1]、長崎 千尋[1]、遠藤 伸[2]、長田 恭一[1]([1]明大農、[2]林原)
○Mikiya OGURI[1], Kaoru TANIZAWA[1], Nana SUZUKI[1], Chihiro NAGASAKI[1], Shin ENDO[2], Kyoichi OSADA[1] ([1]Meiji Univ., [2]Hayashibara)

【目的】
更年期女性の卵巣機能低下に伴う女性ホルモン欠乏は、脂質代謝異常をはじめ様々な症状を引き起こす。卵巣を摘出した閉経後肥満発症モデルラットに、共役リノール酸（CLA）と糖転移ヘスペリジン（GHES）を単独あるいは併用して投与した場合の脂質代謝異常予防効果を検証した。
【方法】
4 週齢の Wistar 系雌性ラットに卵巣摘出手術(対照には偽手術)を施し、2 週間予備飼育した。卵巣を摘出したラットは食餌により 4 群に分け、AIN76 の組成に従って作製した基準飼料（OVX 群)、あるいは基準飼料に 1%CLA を添加した飼料（CLA 群)、1%GHES を添加した飼料（GHES 群)、1%CLA と 1% GHES を添加した飼料（INT 群）とし、偽手術を施したラットには基準飼料（SHM 群）を 53 日間与えて飼育した。麻酔を施し、腹部動脈より採血死させ、肝臓、腎臓、盲腸、子宮、褐色脂肪組織、皮下脂肪組織および内臓脂肪組織（子宮周囲、腎臓周囲、腸間膜）を採取し、脂質代謝に関わる種々のパラメーターを測定した。
【結果】
卵巣を摘出した 4 群は、SHM 群に比べてそれぞれ摂食量が増大し、体重増加量も顕著に大きくなった。卵巣摘出により白色脂肪組織重量が増大したが、CLA の摂取により腎周囲および子宮周囲白色脂肪組織重量、総内臓脂肪組織重量が有意に低くなり、GHES の摂取により腎周囲脂肪組織重量が有意に低くなった。また、GHES の摂取によって盲腸重量が有意に高くなった。血漿中性脂肪と総コレステロールレベルは CLA の摂取によって低くなり、また、CLA と GHES の摂取それぞれで動脈硬化指数（AI）が有意に低くなった。肝臓中性脂肪は CLA の摂取により有意に低くなり、総コレステロールレベルは CLA と GHES の摂取それぞれで有意に低くなった。子宮周囲白色脂肪の脂肪細胞サイズは CLA と GHES の摂取それぞれで有意に小さくなり、これに伴い血中レプチンレベルは CLA の摂取で有意に低くなり、GHES の摂取によって低くなる傾向となった。以上より、CLA と GHES は更年期モデルラットにおいて肥満と高脂血症を予防し、概ね相加的に予防作用を示すことが確認された。

conjugated linoleic acid, glucosyl hesperidin, menopause

発表責任者：小栗幹也（yosamickey@gmail.com）

講演番号：2A08p15
講演日時：3 月 18 日 17:50～ A 校舎 08 会場

# 更年期脂質代謝変動に対する大豆イソフラボン精製物と共役リノール酸の併用摂取効果

# Effects of the combined intake of purified soy isoflavone extract and conjugated linoleic acid against modulation of lipid metabolism with menopause

○谷澤 郁[1]、小栗 幹也[1]、吉富 簾[1]、長田 恭一[1]、戸田 登志也[2]([1]明治大農、[2]株式会社フジッコ)
○Kaoru TANIZAWA[1], Mikiya OGURI[1], Ren YOSHITOMI[1], Kyoichi OSADA[1], Toshiya TODA[2] ([1]Meiji Univ., [2]FUJICCO Co., Ltd.)

【目的】更年期の女性は、卵巣機能低下による女性ホルモンの欠乏に伴い、脂質代謝異常をはじめとした種々の症状を発症する。本研究では、脂質代謝異常を予防または改善する機能性成分として期待されている共役リノール酸（CLA）と大豆イソフラボン精製物（IFP）を、卵巣を摘出した更年期モデルラットに単独あるいは同時に摂取させた場合の脂質代謝変動に対する効果を検討した。

【方法】Wistar 系雌性ラット（4 週齢）の卵巣を摘出し、対照群は偽手術を施した。11 日間の予備飼育後、卵巣を摘出したラットを食餌により 4 群に分けた。偽手術ラットには AIN 93 純化飼料（SHAM 群）を、卵巣摘出ラットには純化飼料（OVX 群)、純化飼料に 1% CLA を添加した飼料（CLA 群)、0.1% IFP を添加した飼料（IFP 群)、1% CLA と 0.1% IFP を添加した飼料（INT 群）をそれぞれペアフィーディングで給餌した。56 日間飼育し、12 時間の絶食後、腹部動脈より採血死させ、種々の組織を採取して脂質代謝に関わる種々のパラメータを測定した。

【結果】CLA の摂取により子宮周囲脂肪の増加が抑制され、IFP との併用摂取で相加的な増加抑制効果が認められた。血漿 TG 濃度は IFP 摂取で改善され、併用摂取で相加的な改善効果が得られた。肝臓の脂肪酸 β 酸化に関わる酵素である CPTⅡ活性は IFP 摂取で高くなり、併用摂取で相加的な活性上昇作用が得られた。また、ACOX の活性は CLA 摂取で低くなったが、併用摂取により対照と同じレベルの活性となった。Insulin レベルは IFP 摂取あるいは併用摂取で有意に低くなった。

【考察】卵巣摘出により体重増加レベルや脂質動態に変動が生じたが、CLA の摂取により内臓脂肪重量の増加が抑えられた。しかし、この結果を支持するような結果は酵素活性では認められなかった。一方、IFP 摂取により血中 Insulin レベルが低くなった。IFP の摂取により更年期の肥満に伴うインスリン抵抗性発症は予防されるかもしれない。以上のように、CLA と IFP の摂取でそれぞれ異なる作用が得られたが、それぞれの詳細な作用機序については今後検討していく予定である。

isoflavone, conjugated linoleic acid, postmenopausal syndrome

講演番号：2B09a01
講演日時：3 月 18 日 09:20～ B 校舎 09 会場

# 蛋白質の安定化能を持つ、低プロオキシダント性抗酸化物質の探索

# Exploring chemicals with low pro-oxidant activity that stabilize proteins

○黒川 洋一、眞柄 佳奈、高見 勇成、安藤 賢司、伊佐 純一（福井県大生物資源）
○Youichi Kurokawa, Kana Makara, Yousei Takami, Kenji Andoh, Jun'ichi Isa (Fukui Pref. Univ.)

【背景と目的】抗酸化物質は、活性酸素種が関わる各種生活習慣病のリスクを下げることが明らかとされているほか、蛋白質などの安定化剤としても期待される。しかしながら、複雑な立体構造を持つ蛋白質に対して有効な抗酸化物質の予測は容易ではなく、抗酸化物質自身は、金属イオンなどの酸化剤存在下で活性酸素種を発生する「プロオキシダント活性」を持ち、細胞毒性等の問題を起こす場合がある。従って、「プロオキシダント活性」が低い、もしくはほとんどない抗酸化物質を探索することが望まれるが、このような性質を持つ化合物の報告はほとんどない。本研究では、「低プロオキシダント性、かつ高抗酸化性の化合物」を探索することを目的とした。
【方法と結果】約 300 種類の抗酸化物質について、銅(I)イオン特異的な指示薬を用いた「銅イオン還元能」、および、銅イオン共存下でのプラスミド DNA の高次構造変化を指標とした「プロオキシダント能」(Aruma Oi *et al. Biochem. J.* 273(1991))の双方を評価したところ、アスコルビン酸やケルセチンなどは銅イオン還元能およびプロオキシダント活性双方が高いこと（a 群)、オイゲノールやフラボノイド類には、銅イオン還元能を持つが、プロオキシダント活性の低い物が存在すること（b 群）を見いだした。ついで、塩化銅および過酸化水素存在下でヒドロキシルラジカルが発生する条件におけるルミノールの化学発光を抑制する能力を指標として、対象化合物の抗酸化能を評価した。その結果、a 群に分類される強力な抗酸化物質には、ルミノール化学発光抑制能、プロオキシダント能の両方とも高い物が多いことが分かった。一方、プロオキシダント能が低い化合物群には、高いルミノール化学発光抑制能を持つ物が見いだされた。解析対象とした化合物の、銅イオン還元能とルミノール化学発光抑制能には一定の正の相関が見られたが、その一方で、銅イオン還元能は低いにも関わらず、高い抗酸化能を示す化合物が存在することが分かった。「低プロオキシダント性、かつ高抗酸化性の化合物」を選抜し、ウシ血清アルブミン等の酸化的分解を抑制する効果を解析したところ、フラボノイド系化合物には期待どおり、高い蛋白質安定化効果が見出された。
【考察】以上の結果は、本研究で選抜された低プロオキシダント性抗酸化物質は、ヒドロキシルラジカルの発生に伴う蛋白質や DNA の酸化的ダメージを抑制する効果を持つことを強く支持する。本法は、優れた抗酸化能を持つ化合物を探索する上で妥当と考えられる。

antioxidant, pro-oxidant, protein stabilizer

発表責任者：黒川洋一（kurokawa@fpu.ac.jp）

講演番号：2B09a02
講演日時：3 月 18 日 09:35～ B 校舎 09 会場

焙煎コーヒーに発見された強力なキサンチンオキシダーゼ阻害活性物質・ピロガロールの活性発現機構研究（その 1）
Mechanism study for xanthine oxidase inhibitory activity of pyrogallol, a potent inhibitor found in roasted coffee beans. Part.1

○本田 沙理[1]、福山 侑弥[1]、西脇 寿[2]、増田 晃子[3]、増田 俊哉[1]（[1]大阪市大院生活、[2]愛媛大院農、[3]四国大生活）
○ Sari HONDA[1], Yuya FUKUYAMA[1], Hisashi NISHIWAKI[2], Akiko MASUDA[3], Toshiya MASUDA[1] ([1]Osaka City Univ., [2]Ehime Univ., [3]Shikoku Univ.)

【目的】2007 年，米国の Choi 等は，コーヒーを飲用することにより痛風発症が減少することを報告した。痛風は最近の食生活の変化により急激に罹患数が増えている生活習慣病の一つとされている。なお，痛風の原因は血清中の過剰な尿酸によるもので，上記の Choi 等は，コーヒーがこの尿酸量を減少させることも報告している。しかし，コーヒー中のどのような成分が尿酸量を減少させているか，現在のところ明らかになっていない。我々は，尿酸生成はプリン代謝系のキサンチンオキシダーゼによることから，コーヒーのキサンチンオキシダーゼ阻害活性（XOI）について検討してきており，これまでに，XOI は焙煎したコーヒーのみに見られ，さらに活性物質はその酢酸エチル可溶部に集中することを報告した。その酢酸エチル可溶部の活性成分として数種のクロロゲン酸ラクトンに加え，最近ピロガロールを同定した。成分の定量分析と活性強度から，焙煎コーヒーにおける XOI にはピロガロールの寄与が高いと判明したが [1)]，ピロガロール自体は，活性測定系であるアルカリ性で不安定であるため，その活性発現機構の化学的な解明を行った。
【方法と結果】ピロガロールの XOI 活性は，アッセイのプレインキュベーション時間で変動する。そこで，XOI アッセイ系を HPLC 分析したところ，ピロガロールは徐々に酸化的ダイマーであるプルプロガリンに変化することがわかった。このプルプロガリン自体の XOI は $IC_{50}$=0.22 μM と非常に強力であることも判明した。従って，XOI には徐々に生成するプルプロガリンも考慮する必要性が考えられた。しかし，ピロガロールの変化を極力少なくするために，酵素（XO）に基質のキサンチンとピロガロールを同時に加えても有意な阻害活性を示したため，ピロガロールの寄与もないとは言えない。そこで，4-メチルピロガロールと 5-メチルピロガロールを用いて同様に XOI を測定した。その結果，4-メチルピロガロールはピロガロールよりは弱いものの $IC_{50}$=33 μM の XOI を示したが，5-メチルピロガロールは，ほとんど活性を示さなかった。4-メチルピロガロールはアッセイ系中でピロガロール同様プルプロガリン（1, 7-ジメチルプルプロガリン）を生成した。しかし，5-メチルピロガロールからはプルプロガリン様物質が生成することはなかった。これらの結果から，ピロガロールが生体内 pH 条件（pH 7.4）を用いたアッセイ系でプルプロガリンに変化することが，その強力な XOI を示す要因になっていると考えられた。なお，本結果を XO との AutoDock によるドッキングシミュレーション結果を含めて考察した結果と併せて報告する。

1）Honda, S and Masuda, T. *J. Agric. Food Chem.*, **64**, 7743—7749, 2016.

Xanthine oxidase, Pyrogallol, Purpurogallin

講演番号：2B09a03
講演日時：3 月 18 日 09:50～ B 校舎 09 会場

リポソーム反応系でのα-トコフェロールと各種抗酸化物の相乗効果に及ぼす反応時間の影響
Effect of reaction time on the synegism of various antioxidants with α-tocopherol in the liposome peroxidation system
○鈴木 敦弓、古川 裕美子、小林 弘司、山内 良子、石川 洋哉（福岡女子大学）
○Atsumi SUZUKI, Yumiko FURUKAWA, Hiroshi KOBAYASHI, Ryoko YAMAUCHI, Hiroya ISHIKAWA (Fukuoka Women's University)

【目的】老化予防や生活習慣病予防を目的とした生体の酸化抑制における抗酸化物の役割を考える上で、細胞膜内に局在する抗酸化物と膜外の抗酸化物の相互作用が注目されている。当研究室では生体膜モデルとして利用されているリポソームを用いて、リポソーム膜内にα-トコフェロールを、膜外に各種抗酸化物を局在させた場合の抗酸化能を評価し、両者の相互作用を薬剤の併用効果解析に汎用される Median effect analysis により解析してきた。その結果、複数の組合せで相乗効果が確認されたが、その効果が経時的にどの様に変化するのかは不明であった。そこで、本研究では抗酸化物間での相乗効果の時間変化に着目し、経時的に TBA 測定あるいは共役ジエンの吸光度測定を行った。
【方法】リポソームの作製には卵黄由来ホスファチジルコリン（PC）を用い、リポソーム溶液を調製した。なお、抗酸化物を膜内に局在化させる際は、リポソーム形成前に抗酸化物を事前に添加し、膜外に局在化させる際はリポソーム溶液作成時に添加した。抗酸化能測定は、リポソーム溶液に AAPH を添加し、1.5, 3, 5 時間後の過酸化物量を TBA 法で測定した。結果から $IC_{50}$ 値を算出し、Median effect analysis による併用効果解析を行い、CI 値（CI＞1：相殺、CI＝1：相加、CI＜1：相乗）で判断した。共役ジエンの増加は A 234 nm により連続的にモニターした。
【結果】リポソーム膜内にα-トコフェロールを、膜外溶液中に各種抗酸化物を局在させて 3 時間反応させた場合、多くの組合せで相乗効果が認められた。フラボノール類ではケルセチン、ミリセチン、フェノール酸類ではプロトカテク酸、没食子酸などで低い CI 値、すなわち高い相乗効果が認められた。同様にカテキン類の ECg、EGCg などでも強い相乗効果が認められた。これらの結果から、リポソーム膜内のα-トコフェロールと膜外のカテコール・ピロガロール化合物が強い相乗効果を発現する可能性が示唆された。なお、この相乗効果の程度（CI 値）は、各化合物のラジカル消去能と一部関連することも示唆された。続いて、相乗効果が認められた組合せにおいて、相乗効果の経時変化を CI 値により確認した結果、カテコール化合物では相乗効果の程度が持続したのに対して、ピロガロール化合物では相乗効果が減弱することが確認された。同様の傾向が、共役ジエンの吸光度測定でも認められた。これらの結果より、膜外のカテコール・ピロガロール化合物は、両者ともに膜内のα-トコフェロールと強い相乗効果を発現して脂質過酸化反応を抑制する可能性があるものの、その相乗効果の持続性はカテコール化合物の方が高いことが示唆された。このことから、リポソーム酸化抑制には、α-トコフェロールとカテコール化合物の組み合わせが有効であると考えられた。

Antioxidant, Lipid Peroxidation, Combination Effects

発表責任者：石川洋哉（ishikawa@fwu.ac.jp）

講演番号：2B09a04
講演日時：3 月 18 日 10:05～ B 校舎 09 会場

白金ナノ粒子は低濃度条件で細胞内の抗酸化機構を制御する
Low-concentration platinum nanoparticles augument intracellular antioxidant activity
○石井 ふらの[1]、濱崎 武記[3]、原田 額郎[3]、樺山 繁[4]、照屋 輝一郎[1,2,3]、白畑 實隆[1,2,3] ([1]九大院・生資環、[2]九大院・シス生、[3]九大院・農院、[4]日本トリム)
○FURANO ISHII[1], TAKEKI HAMASAKI[3], GAKURO HARADA[3], SHIGERU KABAYAMA[4], KIICHIRO TERUYA[1,2,3], SANETAKA SHIRAHATA[1,2,3] ([1]Grad. Shc. Biores. Bioew. Sci., Kyushu Univ., [2]Grad. Sch. Sys. Life. Sci., Kyushu Univ., [3]Fac. Agri., Kyushu Univ., [4]Nihon Trim Co.Ltd)

活性酸素(ROS)による酸化ストレスは種々の疾患の原因となり、ROS を消去することが疾患の予防や改善に繋がると考えられる。そこで我々は、疾患の予防・改善効果が報告されている電解還元水中に、極低濃度で含まれる白金ナノ粒子(PtNps)に注目した。これまでの検討から、PtNps は ROS 消去活性を持つことが示されているが、PtNps の ROS 消去効率は SOD や Catalase と比較して高くはなく、直接的な ROS 消去を期待するには、高濃度(10 ppm 以上)で PtNps を処理することが必要となる。しかし我々は、PtNps を 1 ppm 以下の濃度で処理した場合にも有意な細胞内 ROS 消去活性を確認した。このことから、PtNps による細胞内の ROS 消去活性は直接的なものではなく、抗酸化関連遺伝子発現等を介した間接的な作用であることが推測された。そこで本研究では、低濃度の PtNps による細胞内での ROS 消去活性の確認及びそのメカニズムの解明を目的として検討を行った。方法　PtNps の合成はヘキサクロロ白金酸塩を用い、クエン酸ナトリウムにより還元することで作製した。培養細胞は、L6 細胞(ラット骨格筋細胞株)または HT1080 細胞(ヒト線維肉腫細胞株)を使用した。PtNps の細胞内抗酸化能を確認するために、Menadione または H2O2 による酸化処理後に PtNps で細胞を 2 時間処理した際の細胞内 ROS 量を測定した。また、PtNps の 2 時間処理後、Menadione で処理した際の細胞内 ROS 量についても測定解析を行った。次に、Menadione 処理後、PtNps を 15 分、30 分、60 分と処理し細胞内 ROS 量を測定した。結果・考察　Menadione 処理前に PtNps を取り込ませた条件では ROS 消去活性は見られず、Menadione 処理後に PtNps を処理した条件では ROS 消去活性が確認された。また、PtNps の処理時間別の検討においては、30 分以上処理した場合に細胞内の ROS 消去活性が確認された。更に白金ナノ粒子処理を施した細胞から RNA を抽出し、抗酸化関連遺伝子の発現を RT-PCR にて確認した所、複数の抗酸化関連遺伝子の発現が上昇していることが確認された。この結果から、PtNps が細胞に取り込まれる際、細胞膜との相互作用によって抗酸化関連遺伝子の発現が増強され、細胞内の抗酸化活性が亢進されることが示唆された。

platinum nanoparticle, antioxidation, reactive oxygen species

発表責任者：石井ふらの（ishiifurano@gmail.com）

講演番号：2B09a05
講演日時：3 月 18 日 10:20～ B 校舎 09 会場

液体表面培養したカバノアナタケが生産する抗酸化物質の評価
Characterization of antioxidant from *Inonotus obliquus* cultivated by liquid surface culture
○高柴 則子、藏本 彩加、米田 任伸、櫻井 明彦（福井大工）
○Noriko TAKASHIBA, Ayaka KURAMOTO, Hidenobu YONEDA, Akihiko SAKURAI (Univ. Fukui)

【緒言】
カバノアナタケの天然菌核は、抗酸化作用や抗ウイルス作用などの生理活性を示すことからロシアなどで民間療法に利用されている。しかし、天然菌核の存在量は少なく実用化に向けた研究開発が進んでいない。そこで、当研究室ではカバノアナタケ菌糸体の液体表面培養による生理活性物質の生産について検討してきた。
本発表では、培養菌糸体の抗酸化物質について *in vitro* 及び *in vivo* で評価した結果を報告する。
【方法】
カバノアナタケ（*Inonotus obliquus* NY-1）を液体表面培養法（培地 150 mL、28 ℃）で 30 日間培養し、菌糸体を凍結乾燥･粉砕後にエタノールで抽出した。抽出残渣の菌糸体を熱水でさらに抽出し、抽出液からポリフェノールと多糖を分画した。同様に天然菌核の成分も分画した。培養菌糸体と天然菌核の各画分について、SOD、ORAC、ABTS、FRAP、DPPH の 5 つの方法で抗酸化活性を測定した。さらに、これらの画分の延命とストレス耐性向上についての効果を線虫（*Caenorhabditis elegans* N2）を用いて評価した。各試料と餌となる大腸菌を添加した寒天培地（NGM 培地）で線虫を飼育 (20 ℃) し、生存期間を測定した。また、線虫に熱ストレス (35 ℃)、または酸化ストレス ($H_2O_2$) を与えた際の生存期間も測定した。なお、線虫の生死は接触刺激に対する反射運動で判定した。
【結果と考察】
培養菌糸体のポリフェノール画分とエタノール抽出物に抗酸化活性がみられた。培養菌糸体と天然菌核のポリフェノール画分の抗酸化特性を比較すると、SOD 法において培養菌糸体の方が天然菌核よりも高い活性値を示した。培養菌糸体と天然菌核では、生産される抗酸化物質の構造や組成が異なると考えられる。
次に、抗酸化活性を示した培養菌糸体のポリフェノール画分やエタノール抽出物を線虫に与えたところ、どちらの画分も延命の傾向を示した。また、これらの画分は熱ストレスや酸化ストレスを与えた際にも、生存期間を延長した。現在、カバノアナタケの抗酸化物質によるストレス応答遺伝子の発現について、寿命に関連しているヒートショックプロテイン遺伝子（*hsp-12.6*、*hsp-70*）の転写量解析を進めている。

*Inonotus obliquus*, Antioxidant, liquid surface culture

発表責任者：櫻井明彦（a_sakura@u-fukui.ac.jp）

講演番号：2B09a06
講演日時：3 月 18 日 10:45～ B 校舎 09 会場

# コエンザイム Q10/γ-シクロデキストリン包接複合体の経口摂取による健康増進効果

# Health promotion effects by oral intake of coenzyme Q10/γ-cyclodextrin inclusion complex

○上梶 友記子[1]、寺尾 啓二[1,2] ([1]シクロケムバイオ、[2]神戸大院医)
○Yukiko UEKAJI[1], Keiji TERAO[1,2] ([1]CycloChem Bio, [2]Kobe Univ.)

【諸言】コエンザイム Q10 (CoQ10) は、ミトコンドリアの電子伝達系において ATP 産生に関わる重要な補酵素であり、抗酸化活性を有しフリーラジカル捕捉剤としても作用することが知られている。近年では機能性食品や化粧品等の様々な商品開発に利用されている。しかし、CoQ10 は脂溶性物質であるために水への溶解性が極めて低く、経口摂取時の吸収性が乏しいといった問題がある。そこで、我々はγ-シクロデキストリン (γ-CD) を用いて CoQ10 の生物学的利用能の改善を検討し、CoQ10/γ-CD 包接複合体の経口摂取によって、CoQ10 の吸収性が向上することを明らかにした。本研究では、経口吸収性を高めた CoQ10/γ-CD 包接複合体を摂取することによる肌の状態 (シワ・キメ、弾力性、保湿性) の改善効果を目的として、種々の肌状態測定を行った。更に、酸化ストレスマーカーである 8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン (8-OHdG) を指標に抗酸化作用を評価し、筋細胞保護の指標となるクレアチニンホスホキナーゼ (CPK)・乳酸脱水素酵素 (LDH) をバイオマーカーとして筋肉組織の損傷を評価した。

【方法】30~60 歳の日本人喫煙者 33 名の中から、1) 喫煙頻度が 10~20 本/日、2) 目尻にシワがある、3) BMI が 18~25 の条件を満たし、且つ 4) 皮膚水分量の低い、男女 9 名ずつの計 18 名を抽出した。被験品は CoQ10/γ-CD 包接複合体を CoQ10 換算として 30 mg/日、6 週間摂取した。試験開始前と摂取 3 週間後及び 6 週間後に、肌の状態、尿中の 8-OHdG、血液中の CPK・LDH 等を測定した。肌状態測定については、洗顔し環境調整室にて一定時間待機した上で、シワ・キメ・皮膚弾力性 (戻り率)・皮膚水分量をそれぞれ測定した。

【結果・考察】CoQ10/γ-CD 包接複合体を継続摂取することによって、シワ個数は摂取前と比べて有意に低値を示し、キメ体積率や皮膚弾力性 (戻り率) は摂取前と比べて有意に高値を示した。また、皮膚水分量は増加傾向にあることが示された。バイオマーカーの推移については 8-OHdG の値が低い 8 名を除外し、解析対象者は男女同率の 10 名とした。摂取前及び摂取 6 週間後の 8-OHdG 濃度は 16.7 ± 4.4 ng/mL から 8.1 ± 4.8 ng/mL に有意に減少した。同様に、CPK は 273.2 ± 410.1 IU/L から 88.6 ± 40.1 IU/L に、LDH は 167.6 ± 24.5 IU/L から 150.8 ± 17.9 IU/L に減少した。これらの結果から、CoQ10/γ-CD 包接複合体を継続摂取することによって、持続的に血中 CoQ10 濃度が高まり、抗酸化作用や筋肉組織の保護作用が向上すると共に、酸化ダメージの強い喫煙者の皮膚においては状態が顕著に改善することが認められた。

coenzyme Q10, cyclodextrin, bioavailability

発表責任者：上梶友記子（yukiko.uekaji@cyclochem.com）

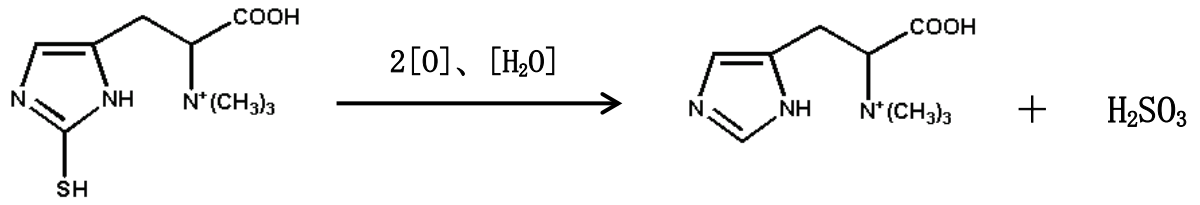
講演番号：2B09a07
講演日時：3 月 18 日 11:00～ B 校舎 09 会場

# タモギタケ中の Ergothioneine の抗酸化機序に関する研究
# The antioxidant mechanism of ergothioneine in golden oyster mushroom

○坪田 知佳[1]、大社 勇太[2]、三谷 茂樹[2]、森光 康次郎[1]([1]お茶大院・食品科学、[2]香栄興業株式会社)
○Chika Tsubota[1], Yuta Okoso[2], Shigeki Mitani[2], Yasujiro Morimitsu[1] ([1]Dep. of Nutr. and Food Sci., [2]KOEI KOGYO Co.,Ltd)

【目的】北海道や東北地方にて栽培されているタモギタケ（*Pleurotus cornucopiae var. citrinopileatus*）は、thiol-Histidine のベタインである Ergothioneine（EGT）を多く含む食材である。EGT は水溶性であり、高い抗酸化性、抗炎症性などが注目されている。しかし、どのような反応機序で抗酸化性を示すのかについては明らかにされていない。そこで、EGT をタモギタケから抽出し、その抗酸化機序をモデル反応より明らかにすることを本研究の目的とした。

【方法・結果】EGT と過酸化水素を 37℃で 24 時間反応させ、反応液を経時的に HPLC 分析し、反応比率を求めた。EGT:$H_2O_2$=1:2 の比率で反応することが示された。しかし、HPLC 分析では EGT の酸化生成物と思われるピークが十分に検出できなかったため、LC-MS 分析を行った。その結果、酸化生成物として 1 つのピークが候補となり、m/z=95、154、198 の MS 検出ピークが確認できた。構造決定には至らなかったため、生成物と思われるピークを分取したところ、黄色味を呈した固形物を得た。分取画分を NMR 等の機器にて分析した結果、酸化生成物は分子量 198 の Hercynine であると同定された。しかし、EGT 一分子に対して等量の Hercynine が検出されなかったため、Hercynine が更に酸化を受けて分解される可能性が考えられた。現在、Hercynine の抗酸化性について検討するために、化学合成による標品作製を進めている。また、ヒト結腸癌由来細胞 Caco-2 を多孔性メンブレンフィルター上に培養して腸管膜モデルを形成し、EGT の腸管吸収実験を行った。腸管膜モデルの腸管側に EGT を 2 時間または 24 時間添加したところ、細胞内への吸収、基底膜側への透過が観察された。




thiol-Ergothioneine　　Hercynine

Ergothioneine, Golden oyster mushroom, Antioxidant

講演番号：2B09a08
講演日時：3 月 18 日 11:15～ B 校舎 09 会場

LC-MS/MS によるリポタンパク脂質の酸化メカニズム解析
LC-MS/MS determination of lipoprotein oxidation mechanisms
○加藤 俊治[1]、伊藤 隼哉[1]、清水 直紀[1]、宮澤 陽夫[2,3]、仲川 清隆[1] ([1]東北大院農・機能分子解析、[2]東北大・未来科学技術共同研究センター、[3]東北大院農・食の健康科学ユニット)
○Shunji Kato[1], Junya Ito[1], Naoki Simizu[1], Teruo Miyazawa[2,3], Kiyotaka Nakagawa[1] ([1]Food and Biodynamic Chemistry Laboratory, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, [2]New Industry Creation Hatchery Center (NICHe), Tohoku University, [3]Food and Health Science Research Unit, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University)

【背景】動脈硬化巣に酸化 LDL が蓄積していることが報告されて以来、動脈硬化の発症・進展には脂質の酸化が関与すると考えられている。しかし、これまでの研究は脂質が酸化した後の“結果”を追っているものが多く、脂質酸化の“メカニズム”を言及した研究は少ない。生体内において脂質の酸化はラジカル、一重項酸素、そして生体酵素によって生じると考えられる。すなわち、これらの脂質酸化機構を特定すれば、動脈硬化発症のメカニズム解明に繋がると考えた。これまで我々はリポタンパクの主要構成リン脂質であるホスファチジルコリン(PC）に着目し、PC の酸化一次生成物である PC ヒドロペルオキシド(PCOOH）が高脂血症者では高値であることを明らかにしてきた。近年では質量分析を用いて、PCOOH の異性体を解析し、リポタンパクのリン脂質は主にラジカルによって酸化されていることを明らかにした。本研究では PCOOH だけでなく、コレステロールエステルおよびトリアシルグリセロールの過酸化物(CEOOH、TGOOH）の解析も行い、血中でリポタンパク粒子がどのような機構で酸化されているのかの解明を目指した。
【方法】リノール酸の酸化物(13 (12, 10, or 9)-hydroperoxy-octadecadienoic acid (HpODE)の各異性体を順相/逆相 HPLC を用いて精製した。各 HpODE と LysoPC (16:0)から PCOOH 異性体標品を合成した。同様に、HpODE とコレステロールあるいはジアシルグリセロールから、CEOOH と TGOOH 異性体標品を調製した。これらの標品を用い、健常者の血漿の PCOOH、CEOOH、TGOOH 異性体を LC-MS/MS によって解析した。
【結果】健常者の血漿 PCOOH 異性体を解析したところ、血漿リン脂質の大部分はラジカルによって酸化すると推察された。他方、血漿から PCOOH に匹敵する量の CEOOH および微量の TGOOH が検出され、大変興味深いことに、CEOOH と TGOOH はラジカル酸化だけでなく一重項酸素酸化によっても生成している可能性を見出した。現在、生体内におけるラジカルや一重項酸素発生機序を解析しつつ、これらの酸化機構についてさらに詳細な検討を進めている。

Oxidative stress, LC-MS/MS, lipoprotein

発表責任者：加藤俊治（tyunkato@gmail.com）

講演番号：2B09a09
講演日時：3 月 18 日 11:30～ B 校舎 09 会場

# 質量分析装置を用いたイミダゾールジペプチドの定量法の確立

# Development of LC-MS method for quantitative analysis of imidazole-dipeptides

○垣花 優希[1]、柴田 貴広[2]、内田 浩二[3]、居原 秀[1]([1]大阪府大理、[2]名大生命農、[3]東大農)
○Yuki KAKIHANA[1], Takahiro SHIBATA[2], Koji UCHIDA[3], Hideshi IHARA[1] ([1]Osaka Prefecture Univ., [2]Nagoya Univ., [3]Tokyo Univ.)

【背景】近年、構成アミノ酸にヒスチジンを含むイミダゾールジペプチドが、抗酸化物質、疲労回復物質として注目されている。イミダゾールジペプチドには、カルノシン、アンセリン、ホモカルノシンなどが含まれ、カルノシンやアンセリンは筋肉や脳に多く存在することが報告されている。一方で、ホモカルノシンは脳での検出はされているが存在量は不明である。

イミダゾールジペプチドの定量分析は、アミノ基の誘導体化と HPLC を組み合わせる方法で行われてきたが、誘導体化効率が試料中のマトリクスに影響される、夾雑物との分離が困難であるなどの問題があり、特に生体試料の分析は容易ではなかった。近年、タンデム型質量分析装置を用いた多重反応モニタリング法（MRM 法）と安定同位体希釈法による簡易で高選択性及び高感度な絶対定量法が開発され、様々な化合物の分析に用いられている。本研究では、イミダゾールジペプチドの MRM 法と安定同位体希釈法を用いた定量解析法の確立を目指した。

【方法】カルノシン、アンセリンの標準物質は市販のものを使用した。ホモカルノシン標準物質は、まず GABA 塩化物を合成し、次いでヒスチジンと縮合させることで調製した。また、イミダゾールジペプチドの安定同位体標識物質は市販されていないので、構成アミノ酸であるヒスチジンまたは β-アラニンの安定同位体を用いて、同様に安定同位体標識物質を調製した。アミノ酸の分離には、アミノ酸を誘導体化せず分離することが可能な Imtakt 社のアミノ酸分析専用カラムを使用した。トリプル四重極型質量分析装置を用い、合成した標準物質を使用し MRM 法の測定条件を最適化した。さらに濃度既知の標準物質を用いて安定同位体標識物質の濃度を算出した。調製した安定同位体標識物質を使用し、生体試料中のイミダゾールジペプチドを安定同位体希釈法で測定した。

【結果】MRM 法の条件を最適化した結果、カルノシン、アンセリン、ホモカルノシンが 100 fmole まで検出可能であった。また、様々な生体試料中に存在するイミダゾールジペプチドを特異的に検出できた。安定同位体希釈法による生体試料の定量分析を行った結果、報告されている通り脳や筋肉においてイミダゾールジペプチドの濃度が高かったことより、この解析法は妥当であるといえる。また、ホモカルノシンは脳における濃度が高いだけではなく、様々な臓器に存在していることが明らかとなった。今回確立した定量法により、抗酸化能などのイミダゾールジペプチドの生理機能の解明に貢献できると考えられる。

Imidazole-dipeptides, Mass spectrometry, Stable isotope dilution assay

講演番号：2B09p01
講演日時：3 月 18 日 14:00～ B 校舎 09 会場

# モリンガ葉抽出物を用いた健康長寿食品の開発【その 1】－抗炎症に対する効果

Effect of Moringa leaf extract on anti-inflammation

○中村 唱乃、坂下 真耶、堀江 健二、金 武祚（（株）ファーマフーズ)
○ Utano NAKAMURA, Maya SAKASHITA, Kenji HORIE, Mujo KIM (Pharma Foods International Co., LTD.)

【目的】

モリンガ（*Moringa oleifera*）はワサビノキ科に属する熱帯性の樹木で、古来より、インドやアフリカ、東南アジア等での伝統医学において、病気を予防する生薬として利用されており、「奇跡の木」と称されている。また、WHO では貧困地域の人々の栄養補給の面から、モリンガの植樹を広く推奨している。我々はモリンガが発芽後 1 年で 5~10 m の高さまで生長することに着目し、成長を促す様々な生理活性物質が含まれていると考え、モリンガの成長力および生命力と健康長寿との関係について科学的に調べた。近年、健康長寿と慢性炎症との相関が注目されていることから、本発表では、モリンガ葉抽出物をヒト単球系細胞に添加し、抗炎症に対する効果を検証したので報告する。

【方法】

モリンガ葉抽出物の調製　モリンガ葉の粉砕物を EtOH で抽出後、濃縮・凍結乾燥し、モリンガ葉 EtOH 抽出物を調製した。この抽出物を用いて、以下の試験に供した。

炎症関連遺伝子の発現解析　ヒト単球系細胞 THP-1 を 24 ウェル培養プレートに播種し、100 ng/mL Phorbol-12-myristate-13-acetate を用いてマクロファージ様細胞に分化させた。分化後、500 ng/mL Lipopolysaccharide を用いて炎症を誘導させると同時に、モリンガ葉 EtOH 抽出物を 0、0.5、1.0 mg/mL の濃度にて添加し、4 時間反応させた。反応後、全 RNA 抽出および cDNA 合成を行い、Real-time PCR 法にて β-アクチンの mRNA 発現量に対する炎症関連遺伝子の mRNA 発現量の割合を定量した。

【結果・考察】

遺伝子発現解析の結果、モリンガ葉 EtOH 抽出物は、TNF-α、IL-1α、IL-1β、IL-6、IL-8 遺伝子等の mRNA 発現が濃度依存的に抑制された。これら遺伝子はすべて炎症時に誘導されるサイトカインであり、モリンガ葉抽出物は炎症性サイトカインの発現を抑制し、抗炎症効果を有することが示唆された。炎症は生活習慣病をはじめ、様々な疾患に関わることから、モリンガ葉抽出物は健康長寿をサポートする機能性食品素材として期待できる。

Moringa, anti-inflammation, TNF-α

講演番号：2B09p02
講演日時：3 月 18 日 14:15～ B 校舎 09 会場

# モリンガ葉抽出物を用いた健康長寿食品の開発【その 2】－糖・脂質代謝に対する効果

Effect of Moringa leaf extract on lipid/glucose metabolism

○伊井野 貴史、中村 唱乃、坂下 真耶、堀江 健二、金 武祚（（株）ファーマフーズ)
○Takashi IINO, Utano NAKAMURA, Maya SAKASHITA, Kenji HORIE, Mujo KIM (Pharma Foods International Co., LTD.)

【目的】

我々はモリンガの成長力や生命力がヒトの健康長寿に寄与できる可能性に着目し、モリンガ葉抽出物の様々な生理機能に関する探索を行っている。近年、糖・脂質代謝改善機能を有し、抗肥満に関与する新たなホルモンとして FGF21（fibroblast growth factor-21）が注目されている。本発表ではヒト培養肝細胞を用いて、モリンガ葉抽出物が FGF21 やその他の糖・脂質代謝関連遺伝子の発現に及ぼす効果について検証したので報告する。

【方法】

モリンガ葉抽出物の調製　モリンガ葉の粉砕物を EtOH で抽出後、濃縮・凍結乾燥し、モリンガ葉 EtOH 抽出物を調製した。この抽出物を以下の試験に供した。

遺伝子発現試験　ヒト肝臓がん由来の HepG2 細胞を 24 ウェル培養プレートに播種し、24 時間血清飢餓後、被験サンプルを添加した。４～８時間インキュベート後、全 RNA を抽出、cDNA を合成し、Real-time PCR 法にてβアクチン mRNA の発現量に対する FGF21、FAS(fatty acid synthase)、G6Pase(Glucose-6-phosphatase)、LDLR(LDL receptor)、Sirt1（sirtuin-1）等、各種、糖・脂質代謝関連遺伝子 mRNA の発現量の割合を定量した。

【結果・考察】

遺伝子発現試験の結果、モリンガ葉 EtOH 抽出物を添加することにより、FAS、G6Pase 遺伝子の mRNA 発現は抑制された。一方、FGF21、LDLR、Sirt1 遺伝子の mRNA は濃度依存的に発現が増強され、中でも脂質代謝のキーとなる FGF21 の発現増強は顕著であった。FGF21 は脂肪細胞に作用してアディポネクチンの分泌を促し、そのアディポネクチンが肝細胞や骨格筋に作用して糖・脂質代謝を活性化することが示されている。本試験結果より、モリンガ葉抽出物は肝細胞における FGF21 の発現を亢進することで FGF21 を介して脂肪細胞でのアディポネクチンの分泌を促進し、脂質代謝を促進する可能性が示唆された。また、FGF21 以外の糖・脂質代謝関連遺伝子の発現も調節しており、モリンガ葉抽出物は糖・脂質代謝を改善する効果を有すると考えられる。現在、これらの作用メカニズムを解明すべく、さらなる解析を行っている。

Moringa, lipid metabolism, glucose metabolism

講演番号：2B09p03
講演日時：3 月 18 日 14:30～ B 校舎 09 会場

# モリンガ葉抽出物を用いた健康長寿食品の開発【その３】－肌に対する効果

Effect of Moringa leaf extract on skin

○山田 裕晃、中村 唄乃、坂下 真耶、堀江 健二、金 武祚 ((株)ファーマフーズ)
○ Hiroaki YAMADA, Utano NAKAMURA, Maya SAKASHITA, Kenji HORIE, Mujo KIM (Pharma Foods International Co., LTD.)

【目的】

我々はモリンガの成長力や生命力がヒトの健康長寿に寄与できる可能性に着目し、モリンガ葉抽出物の様々な生理機能に関する探索を行っている。本発表では、モリンガの機能性解明の一つとして、モリンガがアフリカ等において石鹸や化粧品に伝統的に用いられている点に着目して、加齢に伴う肌の老化を抑制する効果について検証した。肌の老化に対する評価として、真皮に存在する線維芽細胞の増殖活性と角層のターンオーバーに関わるとされる角化細胞増殖因子（Keratinocyte Growth Factor, KGF）の遺伝子発現について検証したので報告する。

【方法】

モリンガ葉抽出物の調製　モリンガ葉の粉砕物を EtOH で抽出後、濃縮・凍結乾燥し、モリンガ葉 EtOH 抽出物を調製した。この抽出物を用いて、以下の試験に供した。

細胞増殖活性の測定　マウス線維芽細胞（NIH/3T3）を 96 ウェル培養プレートに播種し、前培養した。前培養後、低血清条件下（0.1%FBS）において、モリンガ葉 EtOH 抽出物を 0(control)、0.05、0.5、5 μg/mL の濃度にて添加し、24 時間培養した。培養後、MTT 法にて細胞増殖活性を測定した。

KGF 遺伝子の発現解析　ヒト線維芽細胞（HS68）を 24 ウェル培養プレートに播種し、前培養した。モリンガ葉 EtOH 抽出物を 0(control)、5、50、500 μg/mL の濃度にて添加し、4 時間培養した。培養後、全 RNA 抽出、および cDNA 合成を行い、リアルタイム PCR 法にて遺伝子発現量を解析した。

【結果・考察】

細胞増殖活性を測定した結果、モリンガ葉 EtOH 抽出物を 0.5、5 μg/mL 添加した条件において、control に対して、それぞれ、1.4、1.7 倍に濃度依存的に有意な高値を示し、モリンガ葉抽出物は線維芽細胞の増殖を促進させることが明らかとなった。また、KGF 遺伝子発現解析においては、モリンガ葉 EtOH 抽出物を 50、500 μg/mL 添加した条件において、control に対して有意な発現の亢進が認められ、モリンガ葉抽出物は KGF 産生を介し、角化細胞の増殖を促進する可能性が示唆された。以上の結果より、モリンガ葉抽出物は真皮に存在する線維芽細胞および表皮の角化細胞の増殖を促進させることで、ターンオーバーを促進し、肌の老化を抑制すると考えられる。

Moringa, skin, Keratinocyte growth factor (KGF)

講演番号：2B09p04
講演日時：3 月 18 日 14:45～ B 校舎 09 会場

# モリンガ葉抽出物を用いた健康長寿食品の開発【その 4】－育毛に対する効果

# Effect of Moringa leaf extract on hair growth

○田中 小百合[1]、林 英雄[1]、森田 沙代[2]、中村 紀夫[1]、坂下 真耶[1]、堀江 健二[1]、吉永 直子[2]、森 直樹[2]、金 武祚[1]([1]（株）ファーマフーズ、[2]京大院農・応用生命)
○ Sayuri TANAKA[1], Hideo HAYASHI[1], Sayo MORITA[2], Toshio NAKAMURA[1], Maya SAKASHITA[1], Kenji MORIE[1], Naoko YOSHINAGA[2], Naoki MORI[2], Mujo KIM[1] ([1]Pharma Foods International Co., LTD., [2]Kyoto Univ. Applied Life Sciences)

【目的】

我々はモリンガの成長力や生命力がヒトの健康長寿に寄与できる可能性に着目し、モリンガ葉抽出物の様々な生理機能に関する探索を行っている。本発表では、モリンガの機能性解明の一つとして、モリンガの新生力に着目し、育毛に対する効果を検証した。薄毛・脱毛の要因の一つとして、毛根に存在する毛乳頭細胞が産生する Fibroblast Growth Factor-7（FGF-7）の減少があげられる。そこで、モリンガ葉抽出物の FGF-7 遺伝子発現に与える影響ならびに、モリンガ葉抽出物中の FGF-7 遺伝子発現に関わる生理活性成分の探索を行った。

【方法】

モリンガ葉の抽出および分画　モリンガ葉の粉砕物を EtOH で抽出後、濃縮・凍結乾燥し、モリンガ葉 EtOH 抽出物を調製した。モリンガ葉 EtOH 抽出物を水に溶解後、EtOAc で抽出した。得られた EtOAc 抽出物をシリカゲルカラムにより Hexane、EtOAc、MeOH で順次溶出した。得られた各画分は以下のスクリーニングにより活性評価した。活性画分は TLC および HPLC を用いてさらに精製し、活性成分を単離した。

FGF-7 遺伝子の発現解析および活性画分のスクリーニング　ヒト頭髪毛乳頭細胞（HFDPC）にモリンガ葉 EtOH 抽出物を 0（control）、100、500 μg/mL の濃度にて添加し、4 時間培養した。培養後、全 RNA の抽出、および cDNA の合成を行い、リアルタイム PCR 法にて FGF-7 遺伝子の発現量を解析した。同様の方法にて各分画物を評価し、FGF-7 遺伝子の発現量を指標に活性画分を特定した。

活性成分の同定　最終単離物は NMR および GC/MS によって構造解析を行った。

【結果・考察】

HFDPC において、モリンガ葉 EtOH 抽出物を 100、500 μg/mL の濃度にて添加することで、FGF-7 遺伝子の発現量が control に対して、それぞれ、1.6、1.9 倍を示し、濃度依存的な発現上昇が確認された。FGF-7 遺伝子の発現量を指標に各分画物を評価したところ、EtOAc 抽出物から得られた画分に活性が認められた。さらに、その画分を精製し 2 種の活性成分を単離・同定した。現在、動物試験にて、モリンガ葉抽出物の育毛効果を検討しており、併せて報告する。

Moringa, extract, hair growth

講演番号：2B09p05
講演日時：3 月 18 日 15:00～ B 校舎 09 会場

# アブラナ科伝統野菜のスプラウトの機能性について

# Functionality of sprouts in brassicaceous traditional vegetables

○根古谷 竜、下村 講一郎（東洋大院生命）
○RYO NEGOYA, KOICHIRO SHIMOMURA (Grad. Sch. Life Sci. Toyo Univ.)

【緒言】

アブラナ科ツケナ類に属するナカジマナ(*Brassica rapa* L. cv. *nakajimana*)は、石川県七尾市中島町で古くから栽培されている伝統野菜である。これまでにナカジマナに含まれる ACE 阻害活性を有するペプチドを単離し、そのアミノ酸配列を決定した。さらに、スプラウトにおいて ACE 阻害活性がより強くなることを見出した。ナカジマナ同様に、他のアブラナ科野菜にも ACE 阻害活性を示すものが報告されている。そこで本研究では、日本三大漬菜とであるノザワナ、ヒロシマナ、また、高菜の一つであるミイケタカナのスプラウトを調製し、それらの機能性（抗酸化活性と ACE 阻害活性）について検討した。

【材料および方法】

（材料）ナカジマナ、ノザワナ、ヒロシマナ、ミイケタカナ種子を用いた。

（スプラウトの作製）種子 0.3g を秤量し、ガーゼに包み 75% EtOH で 10 秒間殺菌し、滅菌水で 3 回洗浄した。その後、1～2% NaClO で 10 分間殺菌し、クリーンベンチ内にて滅菌水で 3 回洗浄した。滅菌済みプラントボックス（キムタオル）に殺菌した超純水約 15mL を添加し、播種した。暗所（25℃）にて 11 日間栽培した。

（抗酸化活性）スプラウトを液体窒素で凍結後、凍結乾燥した。試料をミルミキサーで粉砕後、10% EtOH で抽出した。抽出液を適宜希釈し、0.2 mM DPPH 試薬と反応後、吸光度(波長 600nm)を測定し、Trolox 相当量(μmol Trolox 相当量/g 乾燥重量)を算出した。

（ACE 阻害活性）上記の抽出液を用いて、超純水で適宜希釈後、ACE-Kit WST(Dojindo Inc.)を用い、吸光度(波長 450nm)を測定し、$IC_{50}$ を算出した。

【結果および考察】

ノザワナ、ヒロシマナ、ミイケタカナのスプラウトは、圃場栽培のものより抗酸化活性が高くなった。ヒロシマナはスプラウトにすることで、ACE 阻害活性が顕著に高くなった。ヒロシマナの ACE 阻害活性本体がナカジマナ同様にペプチドであるか今後検討を行なっていく。今回の結果により伝統野菜の機能性が注目され、伝統野菜の重要性が再認識されることが期待される。

【謝辞】

種子を分与いただいた JA 能登わかばおよび株式会社トーホクに感謝します。

Brassicaceae, ACE inhibition, trolox

講演番号：2B09p06
講演日時：3 月 18 日 15:25～ B 校舎 09 会場

# アラメ属・カジメ属褐藻類から単離したフロロタンニン類の抗糖化活性

# Anti-glycation activity of phlorotannins isolated from *Eisenia* and *Ecklonia* species

○杉浦 真悟[1,6]、南 佑弥[2]、田中 礼士[1,4,6]、三宅 英雄[1,4,6]、モリ テツシ[3,4,6]、植田 充美[5,6]、柴田 敏行[1,4,6]（[1]三重大院・生資、[2]三重大・生資、[3]早稲田大・理工、[4]三重大・海藻バイオ研、[5]京都大院農・応用生命、[6]JST・CREST）

○Shingo Sugiura[1,6], Yuya Minami[2], Reiji Tanaka[1,4,6], Hideo Miyake[1,4,6], Tetsushi Mori[3,4,6], Mitsuyoshi Ueda[5,6], Toshiyuki Shibata[1,4,6] ([1]Mie Univ. Grad. Sch. of Bio., [2]Mie Univ., [3]Waseda Univ., [4]Mie Univ. Algal Res., [5]Kyoto Univ., [6]JST・CREST)

【目的】糖化反応は，体内でタンパク質と糖が非酵素的に結合する反応であり，食品化学の分野ではメイラード反応の名称で知られている。糖化反応によって生成された最終糖化産物（Advanced Glycation Endproducts: AGEs）は，老化の進行や糖尿病，アルハイマー型認知症などの発症との関連性が報告されている。糖代謝および糖化反応中間体のメチルグリオキサール（MGO）は，グルコースよりもタンパク質との反応性が高く AGEs の生成速度も早いことから，AGEs 生成の主要な原因物質と考えられている。本研究では，MGO を介した AGEs 生成経路を対象に，褐藻類由来のポリフェノールであるフロロタンニン類の持つ抗糖化活性を調べた。

【方法】アラメ属褐藻類（アラメ，サガラメ）とカジメ属褐藻類（カジメ，クロメ，ツルアラメ）の乾燥粉末から Folch 法に準じて抽出と分配を行い，フロロタンニン混合物を調製した。ケイ酸カラムクロマトグラフィーと分取 HPLC を用いて，フロロタンニン混合物から Eckol，Fucofuroeckol A，Phlorofucofuroeckol A，Dieckol，8,8’-Bieckol を精製し，混合物も含めて分析サンプルとした。アルブミン（BSA，HSA）と MGO の反応によって生じる AGEs の蛍光強度を測定し，フロロタンニン類の持つ AGEs 生成阻害活性を評価した。

【結果】$EC_{50}$ 値（μg/mL）で比較を行った結果，各藻体から得られたフロロタンニン混合物は，ポジティブコントロールの塩酸アミノグアニジンと比較して，BSA-MGO 経路では約 2 倍，HSA-MGO 経路では約 1.5 倍の AGEs 阻害活性を示した。精製フロロタンニン類では，Phlorofucofuroeckol A が最も強い AGEs 阻害活性を持ち，塩酸アミノグアニジンの $EC_{50}$ 値（mM）より，BSA-MGO 経路では約 20 倍，HAS-MGO 経路では約 13 倍の値を示した。HPLC を用いた解析の結果，フロロタンニン類は，MGO 捕捉活性を持つことも明らかになった。

anti-glycation, AGEs, phlorotannins

発表責任者：柴田敏行（shibata@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：2B09p07
講演日時：3 月 18 日 15:40～ B 校舎 09 会場

# マガキ抽出物は NASH モデルマウスの肝臓において脂肪肝、炎症、アポトーシス、線維化を抑制する

# Oyster extracts attenuate steatosis, inflammation, apoptosis and fibrosis in liver of NASH model mouse

○布田 博敏[1]、渡邉 貢[2]、岡部 浩昭[1]、上甲 紗愛[1]、三浦 佑介[1]、惠 淑萍[1]、伊 敏[3]、濱岡 直裕[4]、三木 恵美子[2]、千葉 仁志[1]([1]北海道大学　大学院保健科学研究院、[2]株式会社渡辺オイスター研究所、[3]北海道大学　大学院医学研究院、[4]北海道立総合研究機構)
○Hirotoshi FUDA[1], Mitsugu WATANABE[2], Hiroaki OKABE[1], Sae JOKO[1], Yusuke MIURA[1], Shu-Ping HUI[1], Min YI[3], Naohiro HAMAOKA[4], Emiko MIKI[2], Hitoshi CHIBA[1] ([1]Faculty of Health Sciences, Hokkaido University, [2]Watanabe Oyster Laboratory Co. Ltd., [3]Graduate School of Medicine, Hokkaido University, [4]Food Processing Research Center, Hokkaido Research Organization)

【背景と目的】近年、非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)の罹患者が増加している。NAFLD の一部は非アルコール性脂肪肝炎(NASH)を経て、肝硬変や肝癌を発症することが報告されている。千葉研究室において、脂肪肝、肝病変、並びに肥満やインスリン抵抗性など、ヒトの NASH 様の症状を呈する新規の NASH モデルマウスが作製された。また同研究室において、ORAC(活性酸素吸収能力)法を指標にして、マガキ抽出物よりポリフェノールの一つである、3,5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol (DHMBA)が単離・同定された。肝培養細胞を用いて DHMBA の抗酸化能試を行った結果、酸化剤(AAPH)に対して、濃度依存的に細胞保護作用を持つことが示された。

本研究は DHMBA を高濃度含むマガキ抽出物(DOE)を NASH モデルマウスに与え、同マウスの肝臓における脂肪肝、炎症、アポトーシス、線維化について抑制作用を観察することを目的とした。

【方法】普通食を 23 週間与え、最後の 3 週間、尾静脈に 3 日おきに 8 回、リン酸緩衝液を注射したマウス群(NC)、高脂肪食(HFD)を 23 週間、最後の 3 週間、尾静脈に 3 日おきに 8 回、酸化 LDL を注射したマウス群(HF-)、HF-群に 5% DOE を与えたマウス群(HF+)の 3 群を作製した。摂餌 24 週目、3 群の肝臓における脂肪肝、炎症、アポトーシス、線維化を観察した。

【結果と考察】脂肪肝において、肝臓の組織切片のオイルレッド O 染色、及び肝臓中のコレステロール、トリグリセリド、遊離脂肪酸の定量を行った結果、HF-群と比較し、HF+群の統計的に有意な減少を観察した。炎症において、肝臓の組織切片のマクロファージとリンパ球特異抗体による免疫組織学的観察、及び real-time PCR による炎症に関わる遺伝子発現量の定量の結果、HF-群と比較し、HF+群の統計的に有意な減少を観察した。アポトーシスにおいて、肝臓の組織切片を用いた TUNEL 法による観察、及び real-time PCR によるアポトーシスに関わる遺伝子発現量の定量の結果、HF-群と比較し、HF+群の統計的に有意な減少を観察した。線維化において、肝臓の組織切片におけるコラーゲン特異抗体による免疫組織学的観察、real-time PCR による線維化に関わる遺伝子発現量の定量の結果、HF-群と比較し、HF+群の統計的に有意な減少を観察した。DOE は肝臓の脂肪肝、炎症、アポトーシスや線維化など、NASH 特有に観察される肝病変を抑制したことから、NASH の予防や治療における可能性が示唆された。

antioxidant, NASH, oyster

発表責任者：布田博敏（hfuda@hs.hokudai.ac.jp）

講演番号：2B09p08
講演日時：3 月 18 日 15:55～ B 校舎 09 会場

赤タマネギ添加発芽玄米の糖尿病および認知症の発症予防の可能性
Possibility of prevention of diabetes and demantia by pre-germinated brown rice with red onion
○大坪 研一[1]、菅原 雅通[2]、中村 澄子[1] ([1]新潟薬大応用生命、[2]新潟醸造試)
○ Kenichi Ohtubo[1], Masamichi Sugawara[2], Sumiko Nakamaura[1] ([1]Niigata Univ. P.A.L.S., [2]Niigata Brew. Ins.)

**【目的】**

演者らは、発芽玄米製造時に、赤タマネギ抽出物を添加することで発芽が促進され、発芽中の微生物の増殖が抑制されることを報告した[1)]。本研究では、糖尿病発症予防、認知症発症予防への可能性を視野に、赤タマネギ添加発芽玄米の食後血糖上昇抑制効果と酵素阻害活性について検討した。

**【方法】**

各種玄米（一般汎用米：コシヒカリ、紫黒米：おくのむらさき、巨大胚芽米：恋あずさ）を試料とし、既報[1)]に従い、通常の水浸漬発芽および浸漬液に赤タマネギを添加する発芽を行い、抗酸化性(ORAC値)、難消化性（メガザイムキットによる RS 含量)、グルタミン酸および GABA 含量（アミノ酸分析)、ポリフェノール含量 (Folin-Ciocalteu 法)、グルコース含量 (F-キット)、アセチルコリンエステラーゼ阻害活性（Ellman らの方法)、β-セクレターゼ阻害活性（BACE1活性測定キット）および炊飯物性（テンシプレッサー、バルク試料、2×3バイト法）を測定した。

**【結果及び考察】**

発芽による機能性成分と玄米の種類における相違を明らかにし、既報[2)]で報告した120分後の AUC（血糖曲線下面積：area under curve）の推定式に従い、3品種の玄米、水発芽玄米、赤タマネギ発芽玄米の AUC の値を算定した結果、3品種とも水発芽に比べ、赤タマネギ発芽の場合に有意に低い値を示した（危険率1%)。また、認知症予防に有効な食材を探索するために、アセチルコリンエステラーゼ阻害活性、β-セクレターゼ阻害活性の測定を行った。この結果、3品種の赤タマネギ発芽玄米、特に紫黒米である「おくのむらさき」において、水発芽に比べて高いβ-セクレターゼ阻害活性を示した。

以上の結果、赤タマネギを添加して発芽させた紫黒米「おくのむらさき」玄米が、食後血糖上昇抑制による糖尿病予防発症予防および認知症予防に有効である可能性が示唆された。

本研究は，文部科学省科学研究費補助金挑戦的萌芽研究「赤タマネギ添加による種子の発芽促進機構の解明」(26560043) および生研センターの SIP「次世代機能性農林水産物・食品の開発」の一部として実施した。

1) S. Nakamura and K. Ohtsubo: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**(3), 572-574, 2011.
2) S. Nakamura and K. Ohtsubo: *J. Appl. Glycosci.*, **62**(2), 53–63, 2015.

rice, pre-germinated brown rice, red onion

発表責任者：大坪研一（ohtsubok@nupals.ac.jp）

講演番号：2B09p09
講演日時：3 月 18 日 16:10～ B 校舎 09 会場

# 鶴の子柿を原料とした柿酢及び柿酢搾り粕の機能性

# Functionality of persimmon vinegar and strained lees made from "TSURUNOKO-GAKI"

○上野 義栄[1]、植村 亮太[1]、高野 慶一[2]([1]京都府中小企業セ、[2]宇治田原むく福祉会)
○Yoshie Ueno[1], Ryota Uemura[1], Keiichi Takano[2] ([1]Kyoto Prefectural Technology Center for Small and Medium Enterprises, [2]Ujitawara Muku Welfare Association)

【目的】京都府宇治田原町は古老柿として有名な干し柿の産地であり、毎年 11 月頃には古老柿の原料である「鶴の子柿」が実る。この鶴の子柿を利用した新たな特産品として、柿酢が開発された。

柿には、抗酸化能を有する柿渋（タンニン）や β-クリプトキサンチン等が含まれている。また、鶴の子柿を原料とした柿酢は、タンニン等のポリフェノールや γ-アミノ酪酸を含み、抗酸化能が確認されたが、β-クリプトキサンチンは含まれなかった。非水溶性の β-クリプトキサンチン等は、柿酢搾り粕に残存していることが予想されたため、柿酢製造（発酵）過程における機能性成分の変化を明らかにするために、柿酢及び柿酢搾り粕の機能性成分の測定及び機能性評価試験を実施した。

【方法】柿酢及び柿酢搾り粕粉末は、宇治田原町内で 2015 年に収穫された鶴の子柿を原料とし、宇治田原むく福祉会で製造された。タンニンは、フォーリン・チオカルト法によりポリフェノール量として、β-クリプトキサンチン及びアミノ酸は HPLC により測定した。抗酸化能は、トロロックスを標準試料とし、H-ORAC 法により測定した。また、SHR ラットを使用した血圧上昇抑制試験、RBL-2H3 細胞脱顆粒抑制試験及び P388 白血病細胞増殖抑制試験を実施した。

【結果】

1) 柿酢には、ポリフェノール 50 mg / 100ml、GABA 20.6 mg / 100ml 等の機能性成分が含まれていた。
2) 柿酢搾り粕粉末には、ポリフェノール 220 mg /100g、GABA 11.2 mg / 100g 及び β-クリプトキサンチン 4.44mg / 100g 等の機能性成分が含まれていた。
3) 柿酢及び柿酢搾り粕粉末の H-ORAC 値は 532 μmol TE/100ml 及び 1,840 μmol TE/100g であった。
4) 柿酢及び柿酢搾り粕粉末を高血圧自然発症ラットに強制単回投与したところ、柿酢は投与後 4 時間後に収縮期の血圧が、柿酢搾り粕粉末は投与後 8 時間後に収縮期及び拡張期の血圧が対照群に比べて有意に低かった($P<0.05$, $P<0.01$)。
5) 柿酢及び柿酢搾り粕粉末は、RBL-2H3 細胞脱顆粒抑制試験により、脱顆粒抑制効果が見られた。また、P388 白血病細胞増殖抑制試験により、増殖抑制効果が見られた。




本研究は、京都府産業廃棄物発生抑制等促進事業費補助金により実施した。

persimmon vinegar, polyphenol, ORAC

講演番号：2B09p10
講演日時：3 月 18 日 16:25～ B 校舎 09 会場

アーユルヴェーダ植物の放射線防護効果
Protective effect of ayurvedic herbs on radiation
○三木 健輔[1,2]、高氏 裕貴[1,2]、HOSSAIN Mohammad Nazir[2,4]、山内 正剛[3]、鮎澤 大[1,2]、藤井 道彦[1]（[1]横浜市大・生命ナノ、[2]イチバンライフ（株）、[3]放医研、[4]Primeasia Univ.）
○Kensuke MIKI[1,2], Yuki TAKAUJI[1,2], Mohammad Nazir HOSSAIN[2,4], Masatake YAMAUCHI[3], Dai AYUSAWA[1,2], Michihiko FUJII[1]（[1]Yokohama City Univ., [2]ICHIBAN LIFE CORP., [3]NIRS, [4]Primeasia Univ.）

動物は放射線、紫外線、酸化ストレス、有害化学物質など様々な環境ストレスに曝されている。これらの環境ストレスは DNA などの細胞構成要素にダメージを与え、細胞機能を阻害し、老化や疾病の原因となる。このようなことから、環境ストレスに対する防護効果を有する物質を探索することは非常に意義がある。

アーユルヴェーダはインド亜大陸で 5 千年の歴史を持つ伝統医学で、10000 種類以上の植物を組み合わせて健康維持や病気治療に用いる。アーユルヴェーダで最も有名な処方の 1 つであるトリファラは、アマラキ（*Emblica officinalis*）、ミロバラン（*Terminalia chebula*）、セイタカミロバラン（*Terminalia bellirica*）の 3 つの果実の混合製剤である。トリファラには様々な健康状態の向上効果が報告されている。我々はトリファラの多彩な効果の 1 つとして、放射線被ばくによる健康影響を軽減する効果の有無を検証した。マウスおよびヒト細胞を用いてトリファラの放射線防護効果を検証した結果、トリファラの投与により半致死線量のエックス線被ばくで生き残るマウス個体やヒト細胞の数が有意に増加した。また、トリファラはヒト細胞レベルで顕著な活性酸素除去作用を有することも見出した。

以上のことから、トリファラの放射線防護効果は、高い活性酸素除去作用によるものであることが示唆された。

Ayurveda, Radiation, Herb

講演番号：2B09p11
講演日時：3 月 18 日 16:50～ B 校舎 09 会場

# 紫外線照射による皮膚障害に対するハマチ動脈球由来エラスチンペプチドの影響

# Effects on elastin peptide from bulbus arteriosus in yellowtail against ultraviolet radiation-induced skin damage in the hairless mouse.

○竹森 久美子[1]、山本 衛[2]、須崎 有亮[2]、西 真吾[2]、米谷 俊[1]([1]近畿大　農、[2]近畿大　生物理工)
○ Kumiko TAKEMORI[1], Ei YAMAMOTO[2], Yusuke SUSAKI[2], Shingo NISHI[2], Takashi KKOMETANI[1] ([1]Faculty od Agriculture, KINDAI Univ., [2]Faculty od Biology-Oriented Science and Technology, KINDAI Univ)

【目的】皮膚では加齢に伴い表皮の萎縮や真皮のコラーゲン・エラスチンの量的質的異常が生じ，結果として弾力のない，菲薄化した皮膚となる。皮膚は常に紫外線曝露を受けており，表皮に対する直接的な傷害作用のほか，結合組織タンパクや細胞増殖関連因子の発現異常を惹起することにより老化現象を促進する（光老化)。特にエラスチンの変性・減少は，しわの形成や弾力性の低下に深く関わっている。本研究では，マウスを用いて紫外線照射による光老化モデルを作成し，皮膚障害に対するハマチ動脈球由来エラスチンペプチドの影響を検討した。
【方法】ハマチ動脈球から Partridge らの方法（1%NaCl 抽出およびオートクレーブ処理）さらに Lansing らの方法（0.1N NaOH，98℃，15 分）により，不溶性エラスチンを分離・精製した。続いて, シュウ酸で分解した後, 熱コアセルベート能を有する可溶性ペプチドを分離し, これを用いて 1%エラスチンペプチド含有ローションを作製した。
　生後 18 週齢雄性ヘアレスマウス（Hos:HR-1）に 2 日に 1 回紫外線照射（UVB 1.5mW/cm$^2$)を行い（UV 群)，照射直後に 1%エラスチンペプチド含有ローション（EL 群）およびプラセボローション（PL 群) を塗布した。18 週間後に皮膚を摘出し, 組織学的観察 (HE 染色), 引張試験, 増殖因子 (TGF, EGF）ならびに細胞周期関連因子（p53，Ki67）の発現解析（realtime PCR 法）を実施した。
【結果】紫外線非照射無処置 Control 群と比較して UV 群の背部皮膚は粗造で硬く、紫外線障害が明瞭であったが、PL 群と EL 群では，これらの程度はいずれも軽微であった。表皮の厚みを顕微計測した結果，UV 群：101 ± 15 μm，PL 群：90 ± 19 μm，EL 群：67 ± 14 μm で、EL 群で最も薄く、且つ各群の間に有意の差が認められた。この皮膚片を用いて引張試験を行ったところ，UV 群では最も低いひずみで破断し、親展性の低下が明瞭であったが、EL 群は UV 群 PL 群に比べ高応力・高ひずみで破断しており，伸展性が良好であった。また，EL 群では増殖因子 EGF の発現が低値であったが、p53 の発現も低値であった。これらの結果に意義については今後の課題である。
【結論】以上の結果より，エラスチンペプチドは，紫外線に対する表皮保護作用を有することが示唆された。今後は，皮膚への浸透性の高い条件を確立するため，エラスチンペプチドの精製や投与量・投与方法を再検討するとともに、その機序を明らかにする予定である。

elastin, UV-B, hairless mouse

発表責任者：竹森久美子（kuriman@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：2B09p12
講演日時：3 月 18 日 17:05～ B 校舎 09 会場

# カルノシンによるミトコンドリア機能増強の分子基盤

# Molecular basis for the carnosine-induced functional activation of mitochondria

○阿部 佳世子[1]、藤井 薫[1]、松本 貴之[2]、片倉 喜範[3] ([1]九大院・シス生、[2]日本ハム中研、[3]九大院・農院)
○Kayoko ABE[1], Kaoru FUJII[1], Takashi MATSUMOTO[2], Yoshinori KATAKURA[3] ([1]Grad. Sch. Sys. Life Sci., Kyushu Univ., [2]NH foods Ltd. R&D center, [3]Fac. Agr., Kyushu Univ.)

目的
イミダゾールジペプチドの一種であるカルノシン（β-Ala-His）には、最近行われたヒト介入試験により脳の老化を抑制する傾向が認められたことから、アンチブレインエイジング食品としての効果が期待されている。そこで我々は、カルノシンを食品として摂取した場合を想定し、腸管における機能性解明を目的として研究を開始した。
方法
本研究においては、ヒト腸管上皮細胞のモデルとしてヒト結腸がん由来 Caco-2 細胞を用いた。カルノシンを添加した Caco-2 細胞における $Ca^{2+}$動態については、Calcium Kit-Fluo4（同仁化学）および IN Cell Analyzer 1000（GE Healthcare）を用いて追跡した。AMPK の活性化は WB により評価した。SIRT1 発現は qRT-PCR により追跡し、$NAD^+$量は $NAD^+$/NADH Quantification Colorimetric Kit（同仁化学）および蛍光プレートリーダーを用いて測定した。アセチル化 PGC-1α は、IP-WB 法により評価した。ミトコンドリア量は、Mito Tracker Red を用いた定量、及び PCR によるミトコンドリア DNA（mtDNA）のコピー数測定により評価した。
結果
まず、細胞内の $Ca^{2+}$レベルをモニタリングした結果、カルノシンは Caco-2 細胞内の $Ca^{2+}$量を有為に増加させることが明らかとなった。さらにカルノシンは、AMPK を活性化するとともに、細胞内 $NAD^+$量を増強した。この $NAD^+$量の増大は、SIRT1 の活性化を誘引し、その結果として PGC-1α の脱アセチル化と活性化を引き起こした。PGC-1α はミトコンドリア生合成のマスターレギュレーターとしても知られており、確かにカルノシンは、ミトコンドリアの数および mtDNA のコピー数を増強することが明らかとなった。以上の結果からカルノシンは腸管上皮細胞において、カルノシン→$Ca^{2+}$流入→AMPK 活性化→$NAD^+$量増強→SIRT1 活性化→PGC1α 脱アセチル化・活性化→ミトコンドリア生合成増強を実現することが明らかとなった。現在、ミトコンドリアの機能性及びミトコンドリア ROS レベルの変動について解析を進めている。

Carnosine, Mitochondria, SIRT1

講演番号：2B09p13
講演日時：3 月 18 日 17:20～ B 校舎 09 会場

ヒゲナガエビ頭部の有効利用と機能性
Utilization and functionality of the prawn heads
○杉山 靖正、久木野 千波、福山 智未、吉岡 涼代、山田 章二、小松 正治（鹿児島大・水）
○Yasumasa SUGIYAMA, Tinami KUKINO, Tomomi FUKUYAMA, Suzuyo YOSHIOKA, Shoji YAMADA, Masaharu KOMATSU (Kagoshima Univ.)

【目的】
ヒゲナガエビ（ *Haliporoides sibogae* ）は、駿河湾から九州までの海域や、東アジア、オーストラリアの水深 200 メートルから 600 メートルの深海の砂底に生息している。鹿児島県ではタカエビと呼ばれ、東シナ海での底引網による漁獲量が多く、生食からフライ、蒸し、焼きなど、様々な料理に使用されている。しかし、漁獲直後から頭部の黒変が進み、見た目の悪さから頭部を除去して販売されることが多く、頭部は廃棄物として処理されることになる。そこで本研究では、未利用資源であるヒゲナガエビ頭部の有効活用を目指し、ヒゲナガエビ頭部を材料に用いた魚醤油の作成を試みた。さらに、作成した魚醤油から機能性物質を単離することを目的とした。
【方法及び結果】
まず、ヒゲナガエビ頭部を材料に魚醤油を作成した。作成方法は、ヒゲナガエビ頭部に水を加えて煮沸後、室温まで冷却してから塩と醤油用麹を加えよく撹拌した。これを樽に移し表面をフィルムで覆い、定期的によく撹拌し、室温で 9 ヵ月間発酵した。発酵終了後は、ろ過して固形物を除き、85 度で 15 分間火入れを行った。室温まで冷却したものを 4 度で一晩静置後、上清を再度ろ過処理し、ヒゲナガエビ頭部を材料に用いた魚醤油を得た。これをタカエビ醤油とした。
次に、作成した魚醤油のアミノ酸分析を行った。その結果、作成したタカエビ醤油の遊離アミノ酸含有量は市販のナンプラーの半分程度であるものの、各アミノ酸の含有率に違いが見られ、材料に用いたヒゲナガエビ頭部の影響が大きいものと考えられた。
続いて、タカエビ醤油、市販のナンプラーをそれぞれ酢酸バッファー（ pH 5.5 ）で 40 倍希釈し、DPPH ラジカル捕捉試験に供したところ、タカエビ醤油は 82.3%、ナンプラーは 55.4%のラジカル捕捉率を示し、タカエビ醤油の高い抗酸化活性が明らかになった。
そこで次に、作成したタカエビ醤油に含まれる抗酸化物質の単離を試みた。タカエビ醤油 1 L を DIAION HP 20 カラムクロマトグラフィーに供し、水で洗浄後、25% MeOH 水溶液、50% MeOH 水溶液、MeOH で順次溶出した。それぞれの溶出画分を DPPH ラジカル捕捉試験に供したところ、全ての画分は複数の活性物質を含むことが明らかになった。そこで、溶媒分画後、Sep-Pak $C_{18}$ カートリッジ、逆相 HPLC を用いて精製することで、1 個の化合物（ 1.8 mg ）を抗酸化物質として単離した。単離した化合物の化学構造は、NMR および MS スペクトルを解析することにより明らかにした。

unused resources, fish sauce, antioxidant

発表責任者：杉山靖正（sugiyama@fish.kagoshima-u.ac.jp）

講演番号：2B09p14
講演日時：3 月 18 日 17:35～ B 校舎 09 会場

# オートファジー誘導食品の探索とその機能性

# Functional evaluation of autophagy-inducing foods

○花山 なな子[1]、小野 友愛[2]、伊東 秀之[3]、片倉 喜範[4] ([1]九大院生資環、[2]九大院シス生、[3]岡山県大保福、[4]九大院農院)
○Nnako HANAYAMA[1], Tomomi ONO[2], Hideyuki ITO[3], Yoshinori KATAKURA[4] ([1]Grad. Sch. Biores. Bioenv. Sci., Kyushu Univ., [2]Grad. Sch. Sys. Life Sci., Kyushu Univ., [3]Grad. Sch. Health., [4]Fac. Agr. Kyushu Univ.)

【目的】
オートファジーは、細胞の自食作用によりタンパク質などの細胞内成分を非選択的に分解する機構であり、栄養飢餓応答、細胞死、ガン、老化など様々な病態に関係することが明らかになっている。これまでに、オートファジー誘導シグナルが、カロリー制限時の抗老化シグナルの一部を形成しうるものと考えられている。そこで本研究では、食品によるオートファジーの誘導とそれによる抗老化の実現を目指し研究を行った。
【方法】
ヒト結腸ガン由来 Caco-2 細胞において、オートファジー活性をモニターすることのできる細胞株 Caco-2(mLC3-AcGFP1)を樹立した。当該細胞株を用い、オートファジー誘導食品成分のスクリーニングを行った。腸管上皮バリア機能は、タイトジャンクション構成タンパク質（Claudin-2、Occludin、ZO-1）のウェスタンブロッティング及び免疫染色法を通じた発現解析、及びオートファジー誘導食品を添加し培養した Caco-2 細胞の経上皮電気抵抗値（TER）の測定により検証した。
【結果】
Caco-2(mLC3-GFP1)細胞を用いて各種食品成分のスクリーニングを行った結果、オートファジーを誘導する食品成分として、ポリフェノール 4 種（Resveratrol、Fisetin、Urolithin A、Oenothein B）を同定した。これらの成分について、内在性 LC3 を指標にオートファジー誘導活性を評価した結果、ザクロ由来ポリフェノールである Oenothein B において LC3-II 量の増強効果が認められた。次に、オートファジー誘導食品のバリア機能増強効果を検証した。その結果、Oenothein B は、Caco-2 細胞における Claudin-2 の発現を低下させ、Occludin 及び ZO-1 の発現は増強させることが明らかとなった。このことは免疫染色実験によっても確認できた。さらに、分化誘導した Caco-2 細胞を用いて TER 値を測定したところ、Oenothein B は TER 値を増強する傾向が認められた。以上の結果から、オートファジー誘導食品である Oenothein B は、タイトジャンクション構成タンパク質の発現制御を通じてバリア機能を増強しうることが明らかとなった。

autophagy, tight junction, pomegranate

講演番号：2B09p15
講演日時：3 月 18 日 17:50～ B 校舎 09 会場

# 培養肝細胞と高尿酸血症マウスにおけるウロリチン A の抗高尿酸血症作用の検討

# Anti-hyperuricemic effect of urolithin A in cultured hepatocytes and model mice

○安達 真一[1]、小松 渡[2]、吉澤 史昭[3,4]、矢ヶ崎 一三[1]([1]宇都宮大・バイオセ、[2]獨協医大、[3]宇都宮大・農、[4]農工大院・連農)
○ Shin-ichi ADACHI[1], Wataru KOMATSU[2], Fumiaki YOSHIZAWA[3,4], Kazumi YAGASAKI[1] ([1]Utsunomiya Univ. C-Bio, [2]Dokkyo Medical Univ., [3]Utsunomiya Univ., [4]Tokyo Univ. of Agri. and Tech.)

【目的】高尿酸血症とは、血中の尿酸濃度が高い状態を意味し、痛風、尿路結石症や腎障害などの様々な疾患の誘因となる状態である。近年、日本において高尿酸血症患者や痛風患者が増加していることから、尿酸値の上昇を抑制する天然物・食品由来の有用成分が期待されている。高尿酸血症の原因のひとつとして、プリン体を多く含む食品の過剰摂取が挙げられる。プリン体は、肝臓においてキサンチンオキシダーゼなどの数種類の酵素により尿酸に代謝される。ウロリチン A は、イチゴやザクロに多く含まれる成分の生体内代謝物のひとつである。ウロリチン A は抗酸化作用、抗炎症作用や抗老化作用などを示すことが報告されている。本研究では、高尿酸血症の予防・改善におけるウロリチン A の有用性について明らかとするために、培養肝細胞におけるウロリチン A の尿酸産生抑制作用の有無とプリン体誘導性高尿酸血症モデルマウスにおけるウロリチン A の尿酸値低下作用の有無について検討することを目的とする。

【方法】モデル肝細胞としてマウス由来 AML12 細胞を用いた。培養 AML12 細胞に尿酸前駆体であるグアノシンおよびイノシンとウロリチン A を同時に作用させ、AML12 細胞の尿酸産生量を測定した。尿酸産生抑制剤であるアロプリノールを陽性対照として細胞実験を行った。次に、高尿酸血症モデルマウスを用いて、ウロリチン A の経口投与が血漿尿酸濃度を低下させるかどうかを検討した。細胞実験に順じ、高尿酸血症モデルマウスにアロプリノールを陽性対照として経口投与した。

【結果と考察】培養肝細胞を用いた検討では、アロプリノールと同様に、ウロリチン A の添加により尿酸の産生が有意に抑制された。また高尿酸血症モデルマウスの血漿尿酸濃度も、アロプリノールと同様にウロリチン A の経口投与により有意に低下した。以上の結果より、ウロリチン A は、抗高尿酸血症作用を有することが強く示唆された。その作用機構の一つとして、ウロリチン A が肝臓での尿酸産生を抑制するためであると考えられる。高尿酸血症モデルマウスにおけるウロリチン A の作用機構についても報告する予定である。

hepatocytes, hyperuricemia, urolithin

講演番号：2B09p16
講演日時：3 月 18 日 18:05～ B 校舎 09 会場

ローヤルゼリーの長期投与は 4 系統ヘテロマウスの健康寿命を延長する
Long-term treatment with royal jelly extends healthy lifespan of genetically heterogeneous mice.
○奥村 暢章[1]、戸田 年彦[2]、小澤 裕介[2]、渡辺 憲史[2]、生田 智樹[1]、立藤 智基[1]、清水 孝彦[2] ([1]株式会社山田養蜂場本社、[2]千葉大院医 先進加齢医学)
○ Nobuaki OKUMURA[1], Toshihiko TODA[2], Yusuke OZAWA[2], Kenji WATANABE[2], Tomoki IKUTA[1], Tomoki TATEFUJI[1], Takahiko SHIMIZU[2] ([1]Yamada Bee Company, Inc., [2]Chiba Univ.)

【目的】高齢化に伴う平均寿命の伸延に伴い、健康寿命との解離が課題となっている。ローヤルゼリー（RJ）はミツバチを、長寿命で生殖能を有する女王蜂に決定付けることから、寿命や健康寿命を改善する素材であることが古来より期待されている。本研究では、米国老化研究所でデザインされた遺伝的多様性を持たせたモデルマウスで、個体寿命を延長する化合物や栄養素のスクリーニングに用いられている 4 系統ヘテロマウス用い、RJ がマウスの個体寿命や健康寿命に及ぼす影響を解析した。【方法】4 系統ヘテロマウスは DBA/2CrSlc（♂）と C3H/HeSlc（♀）を交配させた交雑マウス C3D2F1（♂）に、CB6F1/slc（BALB/cCrSlc♀×C57BL/6NCrSlc、♂）(♀)を交配させることにより得た。寿命試験はオスの 4 系統ヘテロマウスを用いて実施した。RJ は生 RJ の凍結乾燥品と、生 RJ をプロテアーゼ分解後凍結乾燥した酵素分解 RJ を用いた。RJ 投与は、RJ が終濃度 0.5%または 0.05%となるように粉餌に混和し、生後 6 か月から継続的に行った。RJ 投与後、寿命を観察すると伴に、継時的に運動試験を実施し、加齢による運動機能の低下に RJ が及ぼす影響を解析した。24 か月齢で一部のマウスを解剖し、10 ヶ月齢と各種生化学的な解析により比較することで、RJ がマウスの加齢変化に及ぼす影響を解析した。【結果と考察】50%生存日数は 0.5% RJ 投与群でコントロール群と比較して遅延する傾向が認められた。Rotarod 試験, Horizontal bar 試験の結果から、RJ 投与が加齢に伴う協調運動能の低下を予防することが明らかとなった。臓器重量を測定したところ、精巣上体脂肪組織において加齢に伴う減少が、RJ 投与により予防できた。次に寿命に影響することが報告されているシグナル伝達や代謝経路を肝臓中で解析した。その結果 Insulin/IGF 経路であるリン酸化 AKT、AMP 活性化経路であるリン酸化 AMPK、mTOR シグナルの下流であるリン酸化 S6K1 や、SIRT1 と SIRT3 のタンパク質発現は、加齢や RJ 投与における変化が認められなかった。カロリー制限や絶食で変動することが報告されている遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR で解析したところ、*Foxo1*, *Foxo3*, *Sirt1-7* や *Fgf21* の遺伝子発現には変化が認められなかったのに対して、脂質代謝関連遺伝子の加齢変化が RJ 投与で改善された。さらに肝臓中のアセチル化タンパク質レベルをウエスタンブロットで解析したところ、RJ 投与によりタンパク質のアセチル化レベルが亢進した。以上の結果から RJ は少なくとも肝臓中の脂質代謝やタンパク質アセチル化レベルの加齢変化を予防することで老化予防に寄与することが示唆された。【結語】RJ の長期投与は、ヒトと同様に遺伝的な多様性を持たせた 4 系統ヘテロマウスで、協調運動能や肝臓の脂質代謝などの加齢変化を改善することで、健康寿命を延長することが示唆された。

royal jelly, anti-aging, lifespan

発表責任者：奥村暢章（no1780@yamada-bee.com）

講演番号：2B10a01
講演日時：3 月 18 日 09:20～ B 校舎 10 会場

# 食品アレルギー条件下における肺組織の免疫応答の解析

Analysis of immune responses of lung tissues in mouse model of food allergy

○高橋 輝、津田 真人、細野 朗（日大生資科・食品生命）
○Akira TAKAHASHI, Masato TSUDA, Akira HOSONO (Nihon Univ.)

**【目的】** 食品アレルギーの発症は喘息の悪化リスクを亢進することが示唆されているが、抗原の経口摂取が気管支や肺の免疫応答に与える影響は十分に明らかにされていない。本研究では、食品アレルギーモデルマウスである卵白オボアルブミン（OVA）特異的 T 細胞受容体トランジェニックマウス（OVA23-3 マウス）を用いて、食品アレルギー条件下の肺組織において、抗原特異的な T 細胞応答と炎症性細胞の浸潤について解析した。

**【方法】** OVA23-3 マウスに 20%卵白含有飼料を 1 週間自由摂取させ、食品アレルギー状態を誘導した。このマウスから全身免疫系の脾臓、腸管免疫系のパイエル板、気管支関連リンパ組織の肺を採取し、細胞調製した。各組織由来の細胞を OVA 刺激下で 48 時間培養し、培養上清中のサイトカイン（IL-2、IL-4、IL-5、IL-13、IFN-γ）産生量を ELISA 法により定量した。また、フローサイトメーターを用いて、各組織の活性化型の $CD4^+$ T 細胞とアレルギー性炎症応答に関わる顆粒球の割合を解析した。さらに、気管支肺胞洗浄液中の細胞数を測定した。

**【結果】** 卵白含有飼料の摂取によって、脾臓、パイエル板細胞と同様に肺細胞においても、$CD44^{high}CD62L^{low}$ 活性化型 $CD4^+$ T 細胞の増加が観察された。また、どの組織の細胞においても Th1 型サイトカイン（IFN-γ）の産生量が減少し、Th2 型サイトカイン（IL-4, IL-5, IL-13）の産生量が増加した。特に、肺細胞においては IL-4 と IL-5 を高産生しており、IL-5 により増殖・活性化が促進される好酸球（$CD11c^-$ $SiglecF^+$細胞）の割合が有意に増加した。さらに、卵白含有飼料を摂取することにより気管支肺胞洗浄液中の細胞数が有意に増加したことから、気管支への炎症性細胞の浸潤が亢進していることが示唆された。以上から、食品アレルギー条件下での抗原摂取は、腸管免疫系のみならず気管支関連リンパ組織である肺においても、Th2 細胞の活性化と炎症性細胞の増加を誘導することによって、炎症応答が誘導されやすい環境の形成に寄与している可能性が示唆された。

food allergy, lung, T cell

講演番号：2B10a02
講演日時：3 月 18 日 09:35～ B 校舎 10 会場

ナツメグエタノール抽出物が示す貪食活性のメカニズム解析
Analysis of phagocytosis activity on the ethanol extract of *Myristica fragrans*
○平野 里枝[1]、佐々木 藍美[1]、恩田 浩幸[2]、菅原 卓也[3]、西本 壮吾[1]([1]石川県大院・生資環、[2]エスビー食品・中央研、[3]愛媛大・農)
○Rie HIRANO[1], Aimi SASAKI[1], Hiroyuki ONDA[2], Takuya SUGAHARA[3], Sougo NISIMOTO[1]
([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]S&B Foods Inc., [3]Ehime Univ.)

【背景・目的】
インフルエンザウイルスなどのウイルス種の中には、有効なワクチンが存在しない又は、供給量が十分でないウイルス種が存在する。医薬品に依存せず、食生活を通じて自らの免疫活性を高め、感染症を予防することは重要である。カレーの材料である香辛料は、免疫賦活効果や抗炎症効果など様々な保健効果を有しており、東洋医学において薬として使用されているものも数多く存在する。香辛料の 1 つであるナツメグは、世界中で広く使用されている一方で免疫賦活効果は報告されていない。我々は、ナツメグエタノール抽出物がマクロファージの貪食反応を促進し、自然免疫を活性化する可能性を確認した。本研究では、ナツメグ抽出物がどのようにマクロファージの貪食反応を促進するのかを評価した。また、ナツメグ抽出物のマクロファージが産生する炎症性サイトカインに対する効果を検討した。
【方法・結果】
ナツメグエタノール抽出物を添加した際のマクロファージの炎症性サイトカイン産生能を ELISA 法によって検討した。その結果、ナツメグエタノール抽出物に IFN-γの産生促進能が確認された。ナツメグエタノール抽出物は、炎症性サイトカインの産生を促進し、自然免疫を活性化する可能性が確認された。また、貪食反応時に活性化される NF-κB 及び JNK を阻害し、ナツメグエタノール抽出物の貪食促進効果をフローサイトメトリーによって評価した。NF-κB 及び JNK を阻害してもマクロファージの貪食能に変化が認められなかった事から、ナツメグ抽出物は TLR4 を介した貪食反応を促進しないことが示唆された。その一方で、マクロファージが異物を取り込む際に起こるアクチンの再構築を阻害したところ、ナツメグエタノール抽出物添加によるマクロファージの貪食活性促進能が低下した。
以上の結果から、ナツメグエタノール抽出物は TLR4 以外の受容体を介して貪食反応を促進する可能性が考えられ、さらにマクロファージのアクチン再構築を促進することが示唆された。今後は、ナツメグエタノール抽出物の貪食促進効果が TLR4 以外のマンノース受容体などを介した貪食経路であるかどうかを解析する。

phagocytosis, macrophage, spice

講演番号：2B10a03
講演日時：3 月 18 日 09:50～ B 校舎 10 会場

タモギタケ中 β グルカンのマクロファージ分化に対する影響
The influence of ß-1,6/1,3-glucan from *Pleurotus citrinopileatus* on macrophage differentiation
○湊 健一郎、小原 章裕（名城大院農）
○Kenichiro MINATO, Akihiro OHARA (Graduate School of Agriculture, Meijo Univ.)

【背景】
我々はこれまでにいくつかの食用きのこ中多糖が，自然免疫系の細胞（樹状細胞やマクロファージ）に対して炎症促進作用を示すことを報告してきた（1,2）。ところで，それら細胞は未熟な前駆細胞から分化して体内に局在するようになるが，それぞれいくつかのサブタイプが存在する。例えばマクロファージ（Mφ）においては，炎症性サイトカイン IL-6, IL-12 や TNF-α を産生して，炎症の惹起，抗腫瘍作用に関与する 1 型マクロファージ（M1Mφ）や，Th2 型サイトカインによって分化が誘導される炎症抑制型のマクロファージ（M2Mφ）などである。M1 Mφ は炎症促進作用があるため，感染防除において免疫系を活発に働かせることが期待できるが，そのようなマクロファージが過度に増殖した状態が続くと，慢性炎症性疾患を誘発する恐れがある。一方，炎症抑制性サイトカインを産生する M2 Mφ は，M1 Mφ を制御・抑制するなど，免疫系の調整役となるが，感染防御にはあまり働かないと考えられる。これら機能的に異なるマクロファージは，様々な疾患の病態形成に関与していると考えられている。そのため，M1/M2 Mφ のバランスを調節することが，我々の免疫系の恒常性維持に重要であると考える。そこで本実験では，食用きのこタモギタケ中より分離精製した β1,6/1,3-グルカンの，マクロファージ分化に対する作用を単球細胞株 THP-1 を用いて調べた。
【結果】
タモギタケ中の本β1,6/1,3-グルカンは, 成熟Mφに対しては炎症促進作用を示すことをすでに報告(2)しているが，本実験では興味深いことに，単球から Mφ へ分化する際には炎症性サイトカイン TNF や IL-6 の産生を顕著に抑制することが示された。さらに炎症性ケモカイン CXCL9 の発現も抑制した。一方で本グルカンは，分化 Mφ からの抗炎症性サイトカイン IL-10 産生・分泌を増加させた。これらの結果より，タモギタケ中 β1,6/1,3-グルカンには，単球から Mφ への分化の過程において，M2Mφ への分化を誘導している可能性が示唆された。本 β グルカンの成熟 Mφ と Mφ 分化に対するこれら相反する作用の原因について，さらに解析を進めているところである。

(1) Minato et al., Int. J. Immunopharmacol. 40 (2016) 156-163
(2) Minato et al., Int. J. Med. Mushrooms 10 (2008) 235–244

β-glucan, macrophage, mushroom

発表責任者：湊　健一郎（minato@meijo-u.ac.jp）

講演番号：2B10a04
講演日時：3 月 18 日 10:05～ B 校舎 10 会場

パッションフルーツ種子エタノール抽出物の IgE 産生抑制効果に関する研究
Studies on IgE production inhibitory effect of ethanol extract from passion fruit seeds
○水崎 愛[1]、西 甲介[1,2]、玉元 武司[3]、菅原 卓也[1,2]（[1]愛媛大院農、[2]愛媛大食品健康科学研究センター、[3]オキナワ宮古市場）
○Ai MIZUSAKI[1], Kosuke NISHI[1,2], Takeshi TAMAMOTO[3], Takuya SUGAHARA[1,2] ([1]Graduate School of Agriculture, Ehime Univ., [2]Food and Health Sciences Research Center, Ehime Univ., [3]Okinawa Miyako Ichiba)

【目的】　パッションフルーツの葉、果実、果皮および種子中には、多様な生理活性成分が含まれていることがこれまでに報告されている。しかし、それらの抗アレルギー効果、特に IgE 産生抑制効果に関しては報告例がほとんどない。そこで、特に抗アレルギー効果に着目し、パッションフルーツ種子エタノール抽出物（PFS）の IgE 産生に与える影響を検討した。
【方法・結果】　IgE 産生細胞株であるヒト骨髄腫細胞株 U266 細胞およびマウス初代脾臓細胞を用いた。U266 細胞は、成長因子を加えた RPMI 1640 培地、マウス初代脾臓細胞は、5% FBS-RPMI 1640 培地を用い、サンプルを添加した培地で一定時間培養した後、培地中に分泌された IgE 量を酵素抗体法、細胞毒性をトリパンブルー色素排除法、IgE 遺伝子発現を Real-time RT-PCR、シグナル伝達に及ぼす影響をウェスタンブロット法によって評価した。
その結果、PFS は、細胞毒性なく濃度依存的に U266 細胞の IgE 産生を抑制した。この時、細胞内における IgE の mRNA 発現が下方制御されたことから、PFS は *IgE* 遺伝子の転写を阻害することで IgE 産生抑制効果を示すことが明らかになった。パッションフルーツ種子には、抗酸化作用やアンチエイジング作用があることで知られるレスベラトロールと、その類縁体であるピセアタンノールが含まれていることが報告されている。そこで、本研究に用いた PFS 中の成分について、液体クロマトグラフィーを用いて分析した。その結果、PFS 中にもレスベラトロールとピセアタンノールが含まれていることに加え、これらの成分がいずれも IgE 産生抑制効果を有することを確認した。そこで、IgE 産生抑制の作用機序を解明するため、U266 細胞におけるシグナル伝達に与える影響を検討したところ、PFS、レスベラトロールまたはピセアタンノールの作用により、NF-κB の核内移行が有意に抑制されることが明らかになった。また、PFS、レスベラトロールおよびピセアタンノールの経口投与による生体内での影響を検討するため、アレルギー性接触性皮膚炎を誘導したマウスに対する効果を検討した。その結果、22 日間の経口投与により、表皮への炎症性細胞の浸潤や皮膚の肥厚が緩和された。さらに、マウスから回収した脾臓リンパ球の抗体産生量を評価したところ、PFS 投与群では脾臓リンパ球の IgE 産生の抑制傾向が、レスベラトロール投与群およびピセアタンノール投与群では、IgE 産生の有意な抑制が認められた。これらのことから、PFS の IgE 産生抑制活性にはこれらのポリフェノール類が関与することが明らかになった。

antiallergic effect, IgE production, passion fruit seeds

発表責任者：菅原卓也（mars95@agr.ehime-u.ac.jp）

講演番号：2B10a05
講演日時：3 月 18 日 10:20～ B 校舎 10 会場

# 柑橘成分ナリルチン（じゃばら由来）の抗アレルギー作用について

# Anti-allergic effect of narirutin derived from *Citrus jabara*

○角田 出[1]、髙瀬 清美[1]、野村 哲夫[2]、今野 誠[3] ([1]石巻専修大理工、[2]ネイチャーライフ株式会社、[3]株式会社 新薬リサーチセンター)
○Izuru KAKUTA[1], Kiyomi TAKASE[1], Tetsuo NOMURA[2], Makoto KONNO[3] ([1]Ishinomaki Senshu Univ., [2]Nature life Co., Ltd, [3]New Drug Research Center, Inc)

【目的】　抗原をオバルブミン（OVA）に設定し、じゃばら果皮エキス抽出物の投与が、OVA 感染鼻炎モデルマウスの行動および抗アレルギー作用に及ぼす影響を調べた。
【材料および方法】　試験には、BA+LB/cCrSLc 雌（5 週令）マウスを使用した。マウスの OVA 感作鼻炎モデルを作製し、初回感作から、19 日目以降に、毎日、50 μg/100 μL の OVA 溶液 2 μL を、両側鼻腔内に投与した。感作動物を 3 群に分け、じゃばら果皮エキス未投与群（対照群)、同（ナリルチンとして）1 mg/kg 体重/日投与群（低濃度群)、および、同 5 mg/kg 体重/日投与群（高濃度群）を設定した。これに加えて、非感作動物群（無処理群）を設定して、それぞれ、4 週間飼育した。じゃばら果皮エキス抽出物の投与開始より、鼻腔内に OVA（上述）を投与し、アレルギー性鼻炎を惹起し、週 1 回の頻度で、くしゃみ回数と鼻掻き回数を記録した。また、上記試験終了後、血清中の IgE、各種サイトカイン、および、サイトカインシグナル抑制因子 1（SOCS1）の濃度を測定するとともに、摘出・培養した脾臓を用いて、OVA 刺激による上清へのサイトカイン分泌能を調べた。
【結果および考察】　無処理群に対し、対照群はくしゃみ回数、鼻掻き回数ともに、有意に増加した。じゃばら果皮エキス抽出物高濃度群では、両指標とも、2 あるいは 3 週間後より、有意に減少した。低濃度群では、くしゃみ回数は 3 週間後以降、鼻掻き回数は 3 週間後に有意に減少した。

血清 IgE 濃度は、無処理群に対し、対照群で有意（30 倍以上）に上昇した。じゃばら果皮エキス抽出物低濃度・高濃度群は、無処理群および対照群との間に有意差は認められなかった。

血清サイトカインでは、無処理群や対照群に比べて、IL4 が低濃度群、高濃度群ともに有意に低値を示すとともに、IL10、IL-12 や IFN-γ は高濃度群で有意に高値となった。また、高濃度群では、IL13 や IL23 等の炎症性サイトカイン濃度が低下した。加えて、SOCS1 の値が高濃度群で有意に上昇した。

脾臓からのサイトカイン分泌試験では、無処理群に対し、対照群では IL4 分泌量が有意に減少した。

花粉症等のⅠ型アレルギーでは、侵入してきた抗原に対して抗原特異的な IgE が産生される。産生された IgE は肥満細胞の受容体に結合し、感作が成立する。そこに、再度抗原が侵入することにより脱顆粒が起こり、ヒスタミン等の化学伝達物質が放出され、くしゃみ・鼻水等のアレルギー症状が誘発される。本試験では、抗原を OVA に設定し検討したところ、じゃばら果皮エキス抽出物を摂取することにより、くしゃみ・鼻掻き回数が抑制されたが、そこには OVA 特異的 IgE や炎症性サイトカインの低下、SOCS1 を介した調節機構が関与していることが示唆された。

anti-allergic effect, narirutin from Jabara, allergic mouse model

発表責任者：角田　出（kakuta@isenshu-u.ac.jp）

講演番号：2B10a06
講演日時：3 月 18 日 10:45～ B 校舎 10 会場

# チシャトウおよびその含有成分の抗アレルギー作用に関する研究

# Anti-allergic effect of stem lettuce and its several components

○杉本 幸雄[1]、稲垣 勇翔[1]、澤井 陽[1]、藤本 啓太[1]、趙 秋娥[2]、我如古 菜月[3]、伊東 秀之[3]、林 泰資[4]([1]岡山大薬、[2]大森ヘルスケア、[3]岡山県立大、[4]ノートルダム清心女大)
○Yukio SUGIMOTO[1], Yuto INAGAKI[1], Minami SAWAI[1], Keita FUJIMOTO[1], QUI E Zhao[2], Natsuki GANEKO[3], Hideyuki ITO[3], Yasushi HAYASHI[4] ([1]Okayama Univ., [2]Ohmori Hearth Care, [3]Okayama Prefectural Univ., [4]Notre Dame Seishin Univ.)

【目的】チシャトウはチシャ類（レタス、サラダナ）の一種であり、これまでの研究によりマウスのアレルギー性疾患モデルにおけるアレルギー症状を抑制することが明らかになっている。今回、チシャトウ凍結乾燥粉末含有飼料およびチシャトウの主な含有成分であるケルセチン、クロロゲン酸およびカフェ酸）について抗アレルギー作用に関する検討を行った。
【方法】アレルギー性鼻炎症状に対する効果は、BALB/c 系雌性マウスを用いてアレルギー性鼻炎モデルマウスを作製し、チシャトウ葉部 1%含有飼料摂取群と標準飼料摂取群に分け、抗原溶液もしくはヒスタミン溶液の鼻腔内投与により誘発されるくしゃみ反応および鼻掻き行動を 20 分間測定することにより評価した。また、アレルギー性皮膚疾患症状に対する効果は、ICR 系雌性マウスを用いてコンパウンド 48/80 もしくはヒスタミン溶液を背部皮内に投与することにより誘発される後肢による引っ掻き行動を自動掻痒行動測定装置により 60 分間測定することで評価した。さらに、ラット腹腔マスト細胞からのコンパウンド 48/80 誘発ヒスタミン遊離反応に対するチシャトウ抽出物(葉部および茎部）およびその含有成分の効果について検討を実施した。
【結果】チシャトウ葉部 1%含有飼料摂取群では、アレルギー性鼻炎モデルマウスにおける抗原誘発鼻炎症状が抑制された。一方、チシャトウ水抽出物（葉部および茎部）の投与により、抗原誘発鼻炎症状およびヒスタミン誘発鼻症状が抑制されたが、チシャトウの主な含有成分であるケルセチン、クロロゲン酸およびカフェ酸の投与により、抗原誘発鼻炎症状およびヒスタミン誘発鼻症状は抑制されなかった。また、チシャトウ水抽出物（葉部）の投与により、コンパウンド 48/80 誘発掻痒行動が減少した。さらに、ラット腹腔マスト細胞からのコンパウンド 48/80 誘発ヒスタミン遊離反応に対してケルセチン、クロロゲン酸およびカフェ酸は抑制作用を示さなかったが、チシャトウ水抽出物は濃度依存的で有意な抑制作用を示した。
【考察】チシャトウは、ヒスタミンにより誘発されるアレルギー症状およびマスト細胞からのヒスタミン遊離反応を抑制することにより、様々なアレルギー症状を軽減することが示唆された。また、チシャトウの抗アレルギー作用には、ケルセチン、クロロゲン酸およびカフェ酸以外の物質が関与していると考えられた。

stem lettuce, allergy, histamine

発表責任者：杉本幸雄（sugimoto@pharm.okayama-u.ac.jp）

講演番号：2B10a07
講演日時：3 月 18 日 11:00～ B 校舎 10 会場

フェンネル精油とその主成分であるトランス-アネトールの抗アレルギー効果
Anti-allergic effects of fennel essential oil and its major component, *trans*-anethole
○小林 優子[1]、佐藤 晴美[1]、中山 博登[2]、宮里 博成[2]、杉本 圭一郎[2]、実宝 智子[1] ([1]千里金蘭大・食物栄養、[2]長岡香料・技開研)
○Yuko KOBAYASHI[1], Harumi SATO[1], Hiroto NAKAYAMA[2], Hironari MIYAZATO[2], Keiichiro SUGIMOTO[2], Tomoko JIPPO[1] ([1]Senri Kinran Univ., [2]Nagaoka Perfumery Co.)

（目的）近年、日本ではアトピー性皮膚炎、花粉症、気管支喘息、食物アレルギーなどの即時型アレルギー疾患が増加している。即時型アレルギー反応は、マスト細胞が脱顆粒して、顆粒に含まれるヒスタミンやセロトニンなどの生理活性物質が体内に放出されることにより起こる。さらに、脱顆粒が引き金となって産生される腫瘍壊死因子（TNF）-αなどの炎症性サイトカインにより、炎症反応が促進される。これらのことから、マスト細胞の脱顆粒を抑制する物質は、抗アレルギー効果を持つことが期待される。そこで私たちは、植物から抽出される揮発性成分である精油（エッセンシャルオイル）を対象として、マスト細胞の脱顆粒反応ならびにサイトカイン産生に与える影響について検討した。

（方法と結果）マウス由来培養マスト細胞（CMC）に、免疫グロブリン(Ig)E 受容体架橋刺激による脱顆粒反応を誘導し、顆粒から放出されるβ－ヘキソサミニダーゼの遊離量を測定して脱顆粒率を求めた。脱顆粒を誘導する際に、あらかじめ精油を添加してその効果を検討した結果、フェンネル（*Foeniculum vulgare*）精油（FEO）が、濃度依存的に脱顆粒を抑制することが分かった。脱顆粒抑制活性を示す濃度の FEO は、CMC の細胞増殖や生存に影響を与えなかった。さらに、IgE 刺激によって CMC が産生する TNF-α の量を ELISA 法により検討した結果、FEO の添加により TNF-α の産生量が有意に減少した。次に、FEO の有効成分を特定するため、FEO の成分分析を行った。FEO 中には、トランス-アネトール、フェンコン、α-ピネンなどが含まれていた。これらのうち、最も含有量の多かったトランス-アネトールの脱顆粒抑制効果を検討したところ、FEO と同程度の脱顆粒抑制活性を示し、CMC の細胞増殖や生存に影響を与えないことが分かった。

（結論）マスト細胞の脱顆粒抑制効果を有する物質を検索したところ、FEO およびその主成分であるトランス-アネトールが見出された。FEO およびトランス-アネトールは、抗アレルギー効果を有する物質として期待される。

anti-allergic effect, essential oil, mast cell

発表責任者：小林優子（yu-kobayashi@cs.kinran.ac.jp）

講演番号：2B10a08
講演日時：3 月 18 日 11:15～ B 校舎 10 会場

ユズ果皮抽出物摂取による食物アレルギー性下痢に対する抑制効果
Inhibitory effect of *Citrus junos* peel extract on food allergic diarrhea.
○小林 みさき、荒船 貴史、冨山 彩緒里、東 徳洋、山田 潔（宇都宮大農）
○Misaki KOBAYASHI, Takashi ARAHUNE, Saori TOMIYAMA, Norihiro AZUMA, Kiyoshi YAMADA (Utsunomiya Univ.)

【目的】近年特に先進国で問題となっている食物アレルギーは乳幼児期に多く発症するが、その完全な治療法は未だ確立されていない。食物アレルギー患者は原因食品の除去により発症を回避しているが、除去食は栄養学的に望ましいものではない。また、誤食により重篤な症状を引き起こす危険性もある。これまで我々は、アレルギー性皮膚炎や喘息の症状緩和効果が報告されているユズ果皮抽出物の、卵白アルブミン（OVA）摂取による食物アレルギーモデルマウスに対する抑制効果を検討してきた。昨年度の本大会では、全身性のアナフィラキシーショック症状の指標となる体温低下の抑制効果を報告したが、一方で消化管症状に対しては顕著な効果は認められなかった。食物アレルギーの主な症状の一つである下痢や血便といった消化管症状を誘発することは、栄養吸収がうまくできず、特に乳幼児の成長に影響を及ぼすことが考えられる。本研究ではマウスを用いた食物アレルギーモデルにおいて、より消化管症状を強く誘導する条件を設定し、ユズ果皮抽出物摂取による消化管症状への抑制効果ならびに総 IgE 及び抗原特異的 IgG1 産生に対する影響について検討した。
【方法】BALB/ cAJcl マウスに試験期間中、ユズ果皮抽出物 50 mg/日の経口投与を行ったユズ群とユズ果皮抽出物を投与しなかったコントロール群の両群に、OVA/Alum 免疫を 2 回行った後、OVA 50 mg/日の経口投与を 7 回行った。OVA 経口投与後に直腸温測定と採血を行い、アレルギー症状と下痢症状について 5 段階評価でスコア化した。血中の総 IgE、OVA 特異的 IgG1、mMCP-1（murine mast cell protease-1）の各濃度は ELISA 法により測定した。
【結果】消化管に存在する粘膜型マスト細胞から脱顆粒により放出される mMCP-1 の血中濃度はコントロール群と比較してユズ群で有意に抑制された。また、下痢スコアについてもユズ群において抑制される傾向が認められた。これらのことからユズ果皮抽出物摂取により食物アレルギーに起因する下痢症状が改善することが示唆された。また、OVA 経口投与期間中に上昇する総 IgE 及び OVA 特異的 IgG1 の産生が抑制されていた。以上の結果から、ユズ果皮抽出物摂取により腸管粘膜において食物アレルギーの消化管粘膜における I 型アレルギー応答が抑制されることが示唆された。現在、マスト細胞の脱顆粒に対するユズ果皮抽出物の効果や脱顆粒を抑制されているマスト細胞の局在について検討を行っている。

food allergy, *Citras junos*, diarrhea

講演番号：2B10a09
講演日時：3 月 18 日 11:30～ B 校舎 10 会場

マイタケとその成分エルゴステロールの抗アレルギー作用
Anti-allergic effect of *Grifola frondosa* and ergosterol as the component
○川井 絢矢[1]、森 光一朗[1]、大内 謙二[1]、平澤 典保[2] ([1]ホクト、[2]東北大院薬)
○Junya KAWAI[1], Koichiro MORI[1], Kenji OUCHI[1], Noriyasu HIRASAWA[2] ([1]Hokuto Corp., [2]Tohoku Univ.)

【背景・目的】
我々はこれまでに、マイタケの経口投与により花粉症モデルマウスのアレルギー反応が抑制されることを明らかにした(1)。さらに、ラットマスト細胞株 RBL-2H3 細胞の脱顆粒抑制作用を指標にした活性成分の探索から、エルゴステロールとその誘導体がマイタケの抗アレルギー活性成分である可能性を示した(2)。そこで本研究では、マイタケの有効成分候補であるエルゴステロールの効果を細胞実験と動物実験で検証することを目的とした。
【方法】
RBL-2H3 細胞に、マイタケ抽出物、又はエルゴステロールを添加し 20 分培養後、抗原として DNP-HSA を加えて刺激し、30 分後の培養上清中のβ-hexosaminidase 活性およびヒスタミン遊離量を測定した。また、動物での効果を検証するために 5 週齢の雄性 ICR マウスに水酸化アルミニウムと卵白アルブミン(OVA)を腹腔投与し、I 型アレルギーモデルマウスを作製した。マウスには抗原刺激 1 時間前にマイタケ抽出物、又はエルゴステロールを経口投与した。エバンスブルーを尾静脈注射後、抗原を皮内注射して、30 分間の血管透過性の亢進を、溶出色素量と皮膚重量を測定することで評価した。
【結果・考察】
マイタケ抽出物、およびエルゴステロールは、抗原刺激による RBL-2H3 細胞培養上清中のβ-hexosaminidase 活性およびヒスタミン濃度上昇を有意に抑制した。OVA を用いたアレルギーモデルマウスにおいても、マイタケ抽出物、およびエルゴステロールの経口投与群において、皮内抗原注射による溶出色素量と皮膚重量の上昇が抑制される傾向を確認した。以上の結果より、エルゴステロールはマイタケの抗アレルギー活性成分であり、I 型アレルギーを改善する作用を有することが示唆された。
(1)日本薬学会第 134 年会 「マウス眼におけるブタクサ花粉誘発アレルギー性反応に対するマイタケ摂取の効果」
(2)日本農芸化学会 2016 年度大会 「マイタケ由来エルゴステロール誘導体の RBL-2H3 マスト細胞に対する脱顆粒抑制作用」

allergy, ergosterol, mushroom

発表責任者：川井　絢矢（junya.kawai@hokto-kinoko.co.jp）

講演番号：2B10a10
講演日時：3 月 18 日 11:45～ B 校舎 10 会場

ブラジル産レッドプロポリスの in vitro 試験による抗アレルギー作用の評価
In vitro studies of Brazilian red propolis on allergen-induced degranulation and leukotriene $B_4$ release
○上原 沙織、森本 智美、新井 靖子、光井 太一、成田 幸夫、市原 賢二 (アピ（株）長良川リサーチセンター)
○Saori UEHARA, Tomomi MORIMOTO, Yasuko ARAI, Taichi MITSUI, Yukio NARITA, Kenji ICHIHARA (Nagaragawa Research Center, API Co., Ltd.)

【背景】
プロポリスはミツバチが種々の植物の新芽や樹脂から集めた粘着性の物質で、そのエタノールあるいは水抽出物はサプリメントとして利用されている。プロポリスには産地や起源植物によって成分の異なる様々なタイプが存在し、色や香り、効能も異なる。日本国内では、キク科植物（*Baccharis dracunculifolia*）を起源植物とするブラジル（ミナスジェライス州）産グリーンプロポリスがよく使われている。我々は、グリーンプロポリスとは異なるマメ科植物（*Dalbergia ecastophyllum*）を起源植物とするブラジル（アラゴアス州）産のレッドプロポリスに注目し、安全性や機能性について研究を進めている。今回は、機能性研究の一環として検討している抗アレルギー作用について研究成果を報告する。
【方法】
ラットの好塩基球由来細胞株（RBL-2H3）をプレートに播種し、一晩培養した後、培養液を除去し、α-DNP-IgE 溶液中で細胞を 60 分間培養（感作）した。その後、α-DNP-IgE を除去し、各プロポリスのエタノール抽出物を含む培養液を加えて 30 分間培養し、抗原となる DNP-HSA 溶液を加えて細胞を刺激した。抗原刺激 30 分後に上清を回収し、EIA キットを用いて上清中に遊離したロイコトリエン $B_4$（$LTB_4$）を測定した。また、同様の操作によって抗原刺激を行い、上清および細胞溶解液を回収し、β-hexosaminidase の活性を測定して脱顆粒反応への影響を評価した。
【結果および考察】
RBL-2H3 細胞にレッドプロポリス抽出物（終濃度 0.03～30 μg/ml）を処理したところ、濃度依存的な $LTB_4$ 遊離量の減少がみられ、$IC_{50}$ 値は 0.44（95% CI: 0.14～1.34）μg/ml であった。一方、グリーンプロポリス抽出物（終濃度 0.1～100 μg/ml）は、1 μg/ml 以上で濃度依存的な $LTB_4$ 遊離量の減少がみられた。次に、RBL-2H3 細胞にレッドプロポリスの抽出物を終濃度 1～100 μg/ml で処理したところ、濃度依存的に脱顆粒反応によるβ-hexosaminidase の放出を抑制した。同様な脱顆粒抑制作用はグリーンプロポリス抽出物でも認められた。
以上の結果より、レッドプロポリスは、アレルギー反応における $LTB_4$ の遊離抑制作用および脱顆粒抑制作用を有し、グリーンプロポリス以上の抗アレルギー作用を有することが示唆された。今後は、レッドプロポリス抽出物の主要成分の抗アレルギー活性の評価と作用機序を検討する。

Propolis, anti-allergy, leukotriene $B_4$

講演番号：2B10p01
講演日時：3 月 18 日 14:00～ B 校舎 10 会場

# アデノシン類によるマクロファージ炎症促進作用に対するポリフェノールの効果

# Effects of polyphenols on inflammatory responses enhanced by adenosine derivatives in macrophage

○額 惠理香[1]、大西 康太[1]、寺尾 純二[2]、河合 慶親[1] ([1]徳島大院、[2]甲南女子大)
○Erika NUKA[1], Kohta OHNISHI[1], Junji TERAO[2], Yoshichika KAWAI[1] ([1]Tokushima Univ., [2]Konan Women's Univ.)

【背景・目的】マクロファージは、内因性あるいは外因性の様々なリガンド分子を認識し、炎症応答を誘導することによって恒常性維持や生体防御に寄与している。死細胞などから放出されるアデノシン類は、主要な内因性リガンドとしてマクロファージの機能に重要であるが、過剰な炎症や炎症性疾患発症への関与も示唆されている。本研究では、リポ多糖（LPS）によって誘導されるマクロファージ炎症応答におけるアデノシン類の影響について解析するとともに、ポリフェノールによる抗炎症作用や疾患予防効果について、アデノシン類シグナルへの作用に着目した検討を行うこととした。

【方法・結果】マウスマクロファージ様細胞株（J774.1）に、アデノシン類（1 mM）と LPS（1 μg/ml）を共処理したところ、アデノシン 5'-三リン酸（ATP）およびアデノシン（Ado）処理において、LPS によって誘導される一酸化窒素（NO）産生および誘導性 NO 合成酵素（iNOS）発現の促進が認められた。中和抗体を用いた検討により、LPS によって産生される IFN-β のシグナルが iNOS 発現において重要であることが示され、ATP は IFN-β 発現およびそのシグナルによる STAT1 のリン酸化を促進させた。一方、Ado は IFN-β 発現には影響を与えないものの、核内のリン酸化 STAT1 を増加させたことから、ATP と Ado がそれぞれ異なる作用機構で iNOS 発現を促進させることが示された。また、ATP 受容体である P2X7 のノックダウン細胞や各阻害剤などを用いた検討により、ATP は P2X7 受容体を活性化し、$Ca^{2+}$の流入とこれに続く ERK のリン酸化を介して iNOS および IFN-β 発現を促進させることが示唆された。そこで、ATP によって誘導される ERK のリン酸化を指標として、ATP/P2X7 シグナルに対するポリフェノールの作用を検討した。基本骨格や水酸基の数・結合位置の異なる 35 種類のポリフェノールをそれぞれ検討したところ、ガランギンやイソリキリチゲニンなどにより ERK のリン酸化が顕著に抑制された。さらに、これらポリフェノールは、LPS 単独処理によって誘導される IFN-β 発現を変化させない 2 μM の処理において、ATP による発現促進作用を抑制する傾向が認められた。ATP/P2X7 シグナルに対するポリフェノールの作用機構については、P2X7 受容体の活性化による細胞内 $Ca^{2+}$量の変化に着目し、現在検討中である。

【結論】炎症応答を促進させるアデノシン類シグナルは、抗炎症や疾患予防のための新たな標的となりうることが示唆され、ポリフェノールによるシグナル抑制作用を介した抗炎症効果が期待される。

polyphenol, adenosine, macrophage

講演番号：2B10p02
講演日時：3 月 18 日 14:15～ B 校舎 10 会場

# 乾癬モデルマウスにおける赤米ポリフェノールの抗炎症効果

# Anti-inflammatory effects of polyphenol in red rice on mouse psoriasis

○戸田 圭祐[1]、津嘉山 泉[1]、北條 奈々[1]、伊東 秀之[2]、我如古 菜月[2]、川上 祐生[2]、高橋 吉孝[2]、山本（鈴木） 登志子[2]([1]岡山県大院・保健福祉学・栄養、[2]岡山県大・保健福祉学・栄養)
○Keisuke TODA[1], Izumi TSUKAYAMA[1], Nana HOJO[1], Hideyuki ITO[2], Natsuki GANEKO[2], Yuki KAWAKAMI[2], Yoshitaka TAKAHASHI[2], Toshiko SUZUKI-YAMAMOTO[2] ([1]Grad. Sch. Health Welfare Sci., Okayama Pref. Univ., [2]Dept. Nutr. Sci., Okayama Pref. Univ.)

【目的】我々は，炎症誘導性脂質メディエーターのプロスタグランジン（PG）$E_2$ 合成系酵素を標的として，慢性炎症予防のための食品機能性の探索を行っている．$PGE_2$ は，生体内において恒常性の維持のみならず，炎症や癌をはじめとする種々の病態に関与する．$PGE_2$ は，不飽和脂肪酸のアラキドン酸からシクロオキシゲナーゼ（COX）と PGE 合成酵素(PGES)の触媒によって生合成される．$PGE_2$ の合成に関わるアイソザイムのうち，誘導型の COX-2 とミクロソーム型 PGES（mPGES）-1 の高発現により過剰に産生された $PGE_2$ が様々な病態を惹起する．これまでに，$PGE_2$ の合成阻害薬として，非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs）が広く臨床応用されているが，胃粘膜障害，腎機能障害，血小板凝集抑制，心血管疾患といった重篤な副作用を引き起こし，予防的長期服用は難しい．そこで，我々は $PGE_2$ 合成抑制効果を有する，副作用の少ない食品由来成分を探索している．その中で，最近，古代種の赤米に含まれるポリフェノールに COX-2 と mPGES-1 の発現抑制効果を見出したので，難治性皮膚疾患の乾癬における抗炎症効果を検証した．
【方法】今回対象とした乾癬モデルは，Balb/c マウスの耳介に 5%イミキモドクリームを塗布することにより作製した．本研究で用いた赤米ポリフェノールは，主としてカテキン 8 量体が含まれている．実験では，片耳あたり 25，250，2500μg の赤米ポリフェノール，あるいは，溶媒の 50%エタノールのみを塗布し，30 分後に 5%イミキモドクリームを塗布した．5 日間の連続塗布後，正常，乾癬誘導，赤米処理乾癬誘導の耳介厚の測定と病理組織化学的な解析を行った．また，免疫組織化学法により，乾癬耳介における COX-2 と mPGES-1 の局在を解析した．加えて，定量 PCR 法により COX-2 と mPGES-1 ならびに乾癬表皮の炎症や細胞増殖に関わる遺伝子の発現動態を解析した．
【結果・考察】赤米ポリフェノール塗布は，乾癬誘導による耳介厚の上昇を抑えた．病理組織化学的な解析でも，有意に表皮の肥厚を抑制し，真皮の結合組織に浸潤する炎症性細胞を減少させた．また，定量 PCR 法の結果から，赤米ポリフェノールは，*Ptgs2*（COX-2）と *Ptges*（mPGES-1）の発現を量依存的に抑制し，さらに，乾癬特異的炎症増悪因子である *S100a9* とケラチノサイト特異的発現遺伝子の *Krt1* の発現も有意に抑制した．加えて，乾癬の病態形成に重要な Th17 細胞が産生するサイトカイン *Il17a* や *Il22* の発現は，赤米ポリフェノール 25μg の低容量塗布でも有意に減少した．以上の結果より，赤米ポリフェノールは $PGE_2$ 合成系酵素の発現抑制に伴う抗炎症作用を有し，乾癬誘導を抑制することが示唆された．

polyphenol, anti-inflammation, bioactive lipid

発表責任者：山本登志子（toshiko@fhw.oka-pu.ac.jp）

講演番号：2B10p03
講演日時：3 月 18 日 14:30～ B 校舎 10 会場

ガーリック由来有機硫黄化合物の抗炎症作用メカニズムの解明
Anti-inflammatory activity of organosulfur compound derived from garlic

○奥江 紗知子[1]、今井 孝俊[1]、日吉 滉平[1]、飯塚 美玖[2]、横山 令奈[2]、増澤（尾﨑）依[1,2]、細野 崇[1,2]、関 泰一郎[1,2] ([1]日大院生資科、[2]日大生資科)
○Sachiko OKUE[1], Takatoshi IMAI[1], Kohei HIYOSHI[1], Miku IIZUKA[2], Reina YOKOYAMA[2], Yori MASUZAWA-OZAKI[1,2], Takashi HOSONO[1,2], Taiichiro SEKI[1,2] ([1]Nihon Univ. Grad. School, [2]Nihon Univ.)

【目的】がんや心筋梗塞などの血管系疾患は、生活習慣病の終末病態であり、我が国の死因別死亡者数の約半分を占めている。これらの疾患の基盤病態には炎症反応が深く関与している。ガーリックは様々な薬理作用を示し、これらはガーリックに特有な有機硫黄化合物によるものと考えられている。Diallyl trisulfide (DATS)は、ガーリックの主要な香気成分であり、抗がん、抗炎症、抗血栓作用などを示す。演者らは、これまでに DATS がヒト大腸がん細胞の β-tubulin のシステイン残基を *S*-allyl 修飾し、アポトーシスを誘導することなどを報告してきた。さらに、DATS が lipopolysaccharide (LPS)で刺激したマクロファージにおける炎症性サイトカインの産生や、劇症肝炎モデルマウスの肝障害を強力に抑制することを明らかにしている。

本研究では、DATS が炎症シグナルに及ぼす影響について検討し、DATS の抗炎症作用メカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方法】マウス由来マクロファージ細胞株 RAW264.7 に DATS を前処理後、LPS を添加して一定時間培養し、炎症様反応を惹起した。これらの細胞における、NF-κB および MAPKs 関連シグナルのリン酸化を western blotting により解析した。転写因子 NF-κB の核内移行について western blotting および免疫蛍光染色法により解析した。また、LPS 及び Toll-like receptor 4 (TLR4)とそのリンカータンパク質の複合体形成について免疫沈降法および western blotting により解析した。さらに、LPS の細胞への結合能に及ぼす DATS の影響について、蛍光標識した LPS を用いてフローサイトメトリーにより解析した。

【結果】LPS の投与によりマクロファージにおける MAPKs, NF-κB のリン酸化および IκBα の分解が促進された。これらのリン酸化および分解は DATS により抑制された。NF-κB の核内移行、その DNA 結合活性も DATS により阻害される傾向を示し、DATS は NF-κB シグナル、もしくはその上流に作用することが示唆された。また、DATS は TLR4 と細胞内ドメイン MyD88, 細胞外ドメイン MD2 の複合体形成を抑制した。しかしながら、DATS は LPS の細胞への結合にはほとんど影響を及ぼさなかった。

【結論】DATS は TLR4 の活性を阻害することで、NF-κB および MAPKs による炎症シグナルを抑制する可能性が明らかになった。

Inflammation, Garlic, Sulfide

発表責任者：関 泰一郎（tseki@brs.nihon-u.ac.jp）

講演番号：2B10p04
講演日時：3 月 18 日 14:45～ B 校舎 10 会場

# キクイモ塊茎に含まれる抗炎症成分の探索

# Research on anti-inflammatory compounds contained in Jerusalem artichoke tuber

○黒澤 秀梧、市東 佑理、光森 智加、白岩 雅和 (茨城大学農)
○Shugo KUROSAWA, Yuri SHITOU, Chika MITSUMORI, Masakazu SHIRAIWA (Ibaraki Univ.)

【目的】キクイモ *Helianthus tuberosus* の塊茎は、血糖値上昇抑制果があるイヌリンを豊富に含んでおり、機能性食材として注目されている。当研究グループは、イヌリン以外にもキクイモ塊茎に抗がん活性を有する成分が含まれていることを明らかにし、本大会において報告してきた。一方で、関節リウマチ患者がキクイモ塊茎を摂取したところ、リウマチの重症度の指標であるリウマチ因子が摂取前と比べて低下したデータが示された。関節リウマチは炎症性疾患の一種であることから、キクイモ塊茎には抗炎症成分が含まれていることが予想された。今回は、キクイモ塊茎に含まれる抗炎症成分の探索と分画を行ったので報告する。
【方法】キクイモ塊茎粉末から 70 % (v/v)エタノールを用いて成分を振とう抽出し、得られた抽出液を濃縮乾固後、水 - ブタノールで分配し、得られたブタノール層を画分 A、水層を画分 B とした。画分 A をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、1% (v/v)酢酸を含むクロロホルム：メタノール＝75：25 水飽和液を用いて分画を行い、溶出順に 4 画分に分け、それぞれ画分 A2、AB、AC、AD とした。さらに画分 A2 を、組成の異なる 3 種類の溶離液を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーに順次供し分画を行った。さらに最終的な分画は分取 TLC によって行った。分画過程で得られた画分を DMSO に溶解して LPS 処理 RAW264 細胞に添加し、Griess 法により NO 産生量を定量し画分の抗炎症活性を評価した。また、抗炎症活性があった画分の MTT アッセイによって細胞毒性を評価した。
【結果】画分 A と画分 B の両画分に抗炎症活性が見られたが、画分 A により強い活性が確認された。続いて画分 A2、AB、AC、AD の抗炎症活性を評価した結果、画分 A2 が添加濃度 50 μg/mL、100 μg/mL において、コントロールに対しそれぞれ 62.3%、42.9%まで NO 産生を抑制し、4 画分の内最も強い活性を示した。またこの 4 画分に関して、(i)画分と LPS を同時に添加した場合、(ii)LPS 添加後に画分を添加した場合、(iii)画分添加後に LPS を添加した場合を比較したところ、画分 A2 は(i)、(iii)の場合 NO 産生を抑制したが、(ii)の場合はほとんど抑制しなかった。一方、画分 AC と AD は、NO 産生抑制活性は弱いながら、(i)(ii)(iii)いずれの場合も活性を示した。これらの結果より、キクイモ塊茎には NO 産生抑制メカニズムの異なる複数の抗炎症成分が存在することが明らかとなった。続いて、画分 A2 を順次分画し最終的に TLC 上で単一になった画分 A3B2’、A3BC’、A3BD’の活性を測定したところ画分 A3B2’に最も強い活性が確認され、その $IC_{50}$ は 52.6 μg/mL だった。また、画分 A3B2’の細胞毒性を評価した結果、試験した濃度範囲内において細胞毒性は確認されなかった。

Jerusalem artichoke, Anti-inflammation, Functional food

講演番号：2B10p05
講演日時：3 月 18 日 15:00～ B 校舎 10 会場

プロポリスエタノール抽出物の摂取は、Th17 細胞分化を抑制して実験的大腸炎を軽減する
Propolis ethanol extract ameliorate experimental colitis by inhibiting Th17 differentiation
○清水 祐希、鈴木 卓弥（広島大院・生物圏科学）
○Yuki SHIMIZU, Takuya SUZUKI (Hiroshima Univ.)

［目的］潰瘍性大腸炎（UC）は炎症性腸疾患の 1 つであり、厚生労働省の特定疾患に指定されている難病である。現在は外科的な治療や抗体治療が施されているが、副作用や費用の面から食品成分による予防および再燃の抑制が求められている。UC の病因は完全には解明されていないものの、大腸バリア損傷による炎症惹起やヘルパーT(Th)細胞の Th17 偏向が深く関わることが明らかになりつつある。一方でプロポリスは、みつばちが植物源から集めた樹脂製混合物であり、そのエタノール抽出物はフラボノイドや桂皮酸誘導体などの生理活性物質を多く含み、健康食品として利用されている。過去の研究により、このプロポリスのエタノール抽出物（PP）が抗炎症作用や抗酸化作用をもつことが報告されているが、UC に対する軽減作用は十分には明らかにされていない。そこで本研究は、PP による大腸炎軽減作用を検討し、さらにその作用メカニズムを解明する一環として、PP の主要成分のアルテピリン C（Art.C）とカフェ酸フェネチルエステル（CAPE）による大腸バリア機能と Th17 細胞分化へ及ぼす影響を探索した。
［方法、結果］PP（ブラジル産）は（株）山田養蜂場より供与された。まず実験的大腸炎マウスを用いて、PP 摂取による大腸炎軽減作用を検討した。マウス（Balb/C、オス）にデキストラン硫酸ナトリウム（DSS、2%飲水）を 9 日間投与したところ、大腸炎スコア（下痢、血便の評価）の上昇、体重減少、結腸長の短縮を示した。DSS 投与に併せて PP 混餌食（0.3%）を摂取したマウスでは、これら症状が明確に抑制された。このとき PP 摂取は、DSS が引き起こした結腸透過性の上昇（蛍光標識デキストラン透過速度、腸管反転サック法）も抑制し、PP による大腸炎軽減作用には、大腸バリア損傷の抑制が関わることが提案された。続いて、ヒト腸管上皮 Caco-2 細胞を用いて、PP およびその主要成分の Art.C と CAPE によるバリア機能調節作用を検討した。しかしながら、これら 3 種はバリア機能の指標である経上皮電気抵抗に影響しなかった。従って、バリア損傷の抑制は炎症の制御によるものであることが示唆されたため、次に UC で重要とされる Th17 細胞応答に着目した。マウスの脾細胞を用い、PP、Art.C、CAPE による Th17 分化抑制作用を検討した。マウス脾細胞に IL-6 と TGF-$\beta$ を作用させたところ、IL-17 産生が大きく上昇し、Th17 細胞への分化誘導が引き起こされた。PP、Art.C、CAPE による脾細胞の前処理は、それら濃度依存的に IL-17 産生を抑制した（ELISA 法）。
［結論、考察］PP 摂取は、DSS 誘発性大腸炎を抑制した。その作用メカニズムとして、主な含有成分である Art.C と CAPE が大腸バリア機能ではなく、Th17 細胞応答を抑制していることが提案された。

propolis, Th17, ulcerative colitis

発表責任者：鈴木卓弥（takuya@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：2B10p06
講演日時：3 月 18 日 15:25～ B 校舎 10 会場

# 米ぬか摂取による大腸炎抑制機構の解明

# Elucidation of the mechanisms of rice bran supplementation on the suppression of colitis development

○田中 一己[1,2]、アウ ワンピン[1]、冨田 勝[1,2,3]、福田 真嗣[1]([1]慶大・先端生命研、[2]慶大・環境情報、[3]慶大・院・政策・メディア)
○Kazuki Tanaka[1,2], Wanping Aw[1], masaru Tomita[1,2,3], Shinji Fukuda[1] ([1]Inst. Adv. Bio. Sci., Keio Univ., [2]Dept. Environment & Info. Studies., Keio Univ., [3]Grad. Sch. Media and Governance)

近年生活習慣病の予防として食事介入が一般的になってきており，消費者は健康維持のための食事を意識するようになってきている．特に伝統的な日本食が注目をあびており，腸内に良い影響を与えてホストの健康を維持し，プレバイオティクスとプロバイオティクスとしての役割を果たすことが知られている．例えば日本食に含まれる玄米の米ぬかを摂取することによって大腸炎が抑制されることが報告されているが，詳しい分子メカニズムは未だ明らかにされていない．そこで本研究では米ぬか摂取による大腸炎抑制メカニズムの解明を目指した．6 週齢雌性 C57BL/6J マウスに 2.0% Dextran sulfate sodium (DSS)を 10 日間飲水投与させて大腸炎を誘導し，体重変化，Disease activity index (DAI)，大腸の長さおよび炎症性サイトカインである Il-6 と Il-1β の遺伝子発現量によって評価した． AIN-93G (通常食)もしくは 10%米ぬか含有 AIN-93G 食を与え，試験期間中毎日採取した糞便中の細菌叢組成と機能の変化と糞便中の全代謝物質の変化を調べた．AIN-93G 食摂取マウスでは有意な体重減少，DAI の上昇，大腸の短縮，Il-6 と Il-1β 遺伝子発現量の増加が見られたが，10%米ぬか含有 AIN-93G 食摂取マウスではこれらが AIN-93G 食摂取マウスと比較して有意に改善していた．また，腸内細菌叢の組成と代謝物質の濃度も有意に異なっていた．今後は大腸炎を抑制している腸内細菌を特定し，代謝物質との関係を調べることで米ぬか摂取による大腸炎抑制メカニズムを明らかにしたい．大腸炎抑制メカニズムを明らかにすることができれば科学的根拠に基づいた新規の食事介入法の開発につながることが考えられる．

rice bran, colitis, gut microbiota

発表責任者：田中一己（t14532kt@sfc.keio.ac.jp）

講演番号：2B10p07
講演日時：3 月 18 日 15:40～ B 校舎 10 会場

DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスに対する植物発酵エキスの効果
Effects of fermented plant-based extract on colitis induced by dextran sulfate sodium in mouse.
○山本 美菜[1]、松井 梓[1]、村上 允唯[2]、中村 泰輔[2]、渡辺 敏郎[1]([1]園田学園女大・食栄、[2]機能性食品開発研究所)
○Mina YAMAMOTO[1], Azusa MATSUI[1], Nobutada MURAKAMI[2], Taisuke NAKAMURA[2], Tosiro WATANABE[1] ([1]Sonoda Women's Univ., [2]Functional Food Creation Research Inst.)

【目的】潰瘍性大腸炎は大腸の粘膜にびらんや潰瘍ができる大腸の炎症性疾患で、我が国の患者数は現在、急速に増え続け、厚生労働省の特定疾患治療研究対象疾患（難病）のひとつに指定されている。硫酸多糖体のひとつであるデキストラン硫酸ナトリウム（DSS）水溶液をマウスに摂取させると潰瘍性大腸炎モデルが得られることが報告されており、このマウスを用いることで潰瘍性大腸炎を抑制する素材がスクリーニングできる。本研究では、DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスに植物発酵エキスを与え、潰瘍性大腸炎抑制効果について検討したので報告する。
【方法】植物発酵エキスは、野菜や果実を中心に皮や種子ごと黒糖に漬け込み抽出したエキスにビワ葉や霊芝の煎じ液、穀類、海藻などを加え、発酵・熟成させた製品「陽命源 GOLD®」（㈱機能性食品開発研究所）を使用した。5 週齢の雄性 BALB/c マウスを 1 群 8 匹となるよう陰性対照群、陽性対照群、5%植物発酵エキス群の 3 群に分け自由摂取により評価した。DSS 水は 3%（w/w）とし、7 日間自由摂取させ、体重と飼料摂取量は 2 日おきに測定した。また糞便を観察し、その性状をスコア化した。イソフルランにて麻酔後、断頭採血し、解剖は、各種臓器を摘出して、それぞれ重量を測定し、大腸は長さを測定した。炎症性サイトカイン（IL-6、TNF-α）は血清から ELISA 法により定量し、また摘出した盲腸内容物中のビフィズス菌数を調べることで植物発酵エキスの効果について検討した。データは平均値±標準誤差で示し、群間での有意差は統計ソフト「IBM SPSS Statistics 20」を用いて Bonferroni の多重比較検定をおこない、$p<0.05$ を統計学的に有意と判定した。
【結果および考察】陽性対照群のマウスは、DSS 水の摂取により軟便や血便がみられたが、植物発酵エキス群のマウスは、糞便色が黒色に変化するだけであった。DSS 摂取モデルの潰瘍性大腸炎は、大腸が委縮することが知られているが、本研究においても陰性対照群の大腸の長さ 8.34±0.24 cm に対し、陽性対照群は 5.94±0.17 cm と有意に委縮した。植物発酵エキス群の大腸の長さは 7.67±0.21 cm で大きな委縮はなく、陰性対照群との有意差も認められなかった。また炎症性サイトカインである IL-6 および TNF-α は、陽性対照群で有意に増加したが、植物発酵エキス群では有意に低値を示した。盲腸内容物中のビフィズス菌数は、陰性対照群と比べると陽性対照群と植物発酵エキス群は有意に減少したが、陽性対照群と比べると植物発酵エキス群は有意に減少を抑制した。以上の結果より、植物発酵エキスは、DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスに対して潰瘍性大腸炎抑制効果があることが示唆された。

inflammation, fermentention, dextran sulfate sodium

講演番号：2B10p08
講演日時：3 月 18 日 15:55～ B 校舎 10 会場

カシスアントシアニンによる KK-$A^y$マウスおよび RAW 264.7 細胞での慢性炎症抑制作用
Inhibitory effects of Black currant anthocyanins on chronic inflammation in KK-$A^y$ mouse and RAW 264.7 cells

○小舘 めい、西山 広亮、前多 隼人（弘前大農学生命）
○Mei KODATE, Kosuke NISHIYAMA, Hayato MAEDA (Hirosaki Univ.)

【目的】 カシス(*Ribes nigrum*)は抗酸化活性が強く、活性酸素を消去するアントシアニンを豊富に含むことから、疾病の予防に有効な食品と考えられている。また、カシスはブドウなどの他の果実と異なり Delphinidin-3-rutiniside(D3R)、Cyanidin-3-rutinoside(C3R)を多く含有している。本研究ではカシスによる肥満を起因とした慢性炎症状態の改善作用の検討を目的とし、肥満モデルマウスに対するカシスアントシアニンの作用及びカシスに含まれる主要アントシアニンによる抗炎症作用の比較検討を行った。

【方法】 カシス粉末は(株)光洋商会から入手した。実験動物には 5 週齢のオスの KK-$A^y$マウスを使用した。飼料は 20%の脂質を含む高脂肪食を用いコントロール群、カシス群(カシス粉末 0.1%)の 2 群で実験を行った。4 週間の実験飼育の後、解剖を行い臓器重量の測定、及び血漿成分の分析を行った。また肝臓、白色脂肪組織での炎症関連遺伝子の mRNA 発現量の変化について RT-PCR 法で評価した。

抗炎症作用の検討は Lipopolysaccharide(LPS)で刺激したマウス由来 RAW264.7 細胞を用いて行った。24 ウェルプレートに細胞を播種し、24 時間後に LPS 刺激し、D3R、C3R を細胞に添加した。比較対象として多くの果実に含まれるアントシアニンである Delphinidin-3-glucoside(D3G)、Cyanidin-3-glucoside(C3G)を(5、10、20 μM)添加した。添加 24 時間後に細胞と培地を回収した後、炎症関連遺伝子の mRNA 発現量を RT-PCR 法で評価し、培地中の NO 濃度は Griess 法で測定した。

【結果】 動物実験においてカシス群の白色脂肪組織ではコントロール群と比較して、IL-6(Interleukin-6)、MCP-1(Monocyte chemotactic protein-1)の mRNA 発現量に減少傾向がみられ、iNOS(Inducible NO synthase)、COX-2(Cyclooxygenase-2)の mRNA 発現量が有意に低下した。肝臓ではコントロール群と比較して、カシス群は TNF-α(Tumor necrosis factor-α)の mRNA 発現量が減少傾向を示した。LPS 刺激した RAW264.7 細胞において、C3R を 5、10、20 μM 添加した細胞では他のアントシアニンを添加した細胞と比較して COX-2 の mRNA 発現量が有意に低下した。

これらの結果から、カシスは慢性炎症状態の改善に効果があることが示唆された。また、アントシアニンの種類により抗炎症作用に違いがある可能性が示された。

anthocyanin, black currant, chronic inflammation

発表責任者：前多隼人（hayatosp@hirosaki-u.ac.jp）

講演番号：2B10p09
講演日時：3 月 18 日 16:10～ B 校舎 10 会場

パプリカキサントフィルによる脂肪細胞での慢性炎症状態の改善作用
Effects of paprika xanthophyll on chronic inflammation on adipocyte
○三上 翔平[1]、西野 梓[2]、鷹羽 武史[2]、眞岡 孝至[3]、前多 隼人[1] ([1]弘前大学、[2]江崎グリコ（株）健康科学研究所、[3]（一財）生産開発科学研究所)
○ Shohei MIKAMI[1], Azusa NISHINO[2], Takeshi TAKAHA[2], Takashi MAOKA[3], Hayato MAEDA[1] ([1]Hirosaki Univ., [2]Ezaki Glico, [3]general Foundation production development Science Research Institute)

【目的】 パプリカ色素は赤色の食品天然色素として食品添加物にも利用されており、種々のキサントフィルを含んでいる。これまでの研究でカプサンチンとカプソルビンが脂肪細胞での慢性炎症状態を軽減する作用があることを in vitro 試験で明らかにしている(1)。しかしパプリカに含まれる他のキサントフィルの機能の報告は少ない。本研究では、赤いパプリカに特徴的なククルビタキサンチン A に着目し、パプリカキサントフィルによる脂肪細胞での慢性炎症軽減作用について、脂肪細胞とマクロファージ様細胞の共培養による in vitro 試験によって評価した。

【方法】 マウス由来 3T3－L1 前駆脂肪細胞を分化誘導培地Ⅰ（10 μg/ml insulin、0.25 μM dexamethasone、0.5 mM isobuthylmethylxanthine）で 2 日間、分化誘導培地Ⅱ（5 μg/ml insulin）で 4 日間培養し、脂肪細胞へ分化誘導した後、マウス由来 RAW264.7 マクロファージ様細胞を $1\times10^5$ cells/well 加え共培養した。次にカプサンチン（10 μM）、ククルビタキサンチン A（10 μM）、カプソルビン（10 μM）を添加し、24 時間後に培地上清および細胞を回収した。炎症関連遺伝子である IL-6、MCP-1（monocyto chemoattractant protein-1）、COX-2（cyclooxygenase-2）の mRNA 発現量の変化を real time RT-PCR 法にて、培地上清中の IL-6、MCP-1 のタンパク質発現量を ELISA 法にて評価した。また COX-2 と iNOS（inducible nitric oxide synthase）のタンパク発現量をウェスタンブロッティング法にて評価した。

【結果】 コントロールの細胞と比較して、各種パプリカキサントフィルを添加した細胞では、炎症惹起に関与する IL-6 の mRNA 発現が低下傾向を示し、特にククルビタキサンチン A 及びカプソルビン添加細胞では、MCP-1 と COX-2 の mRNA 発現量の有意な低下が認められた。また培地中の IL-6、MCP-1 濃度もパプリカキサントフィル添加細胞で低下傾向が認められ、ククルビタキサンチン A 添加細胞では有意に低下した。更に iNOS と COX-2 のタンパク質発現はククルビタキサンチン A 添加細胞で低下傾向及び有意な低下が示された。これらのことから、カプサンチン、カプソルビンだけでなく、ククルビタキサンチン A にも脂肪組織の慢性炎症状態を軽減する作用があることが示唆された。
(1)Maeda H, Saito S, Nakamura N, Maoka T, ISRN Inflammation, 2013：763758（2013）

carotenoid, adipocyte, inflammation

発表責任者：前多 隼人（hayatosp@hirosaki-u.ac.jp）

講演番号：2B10p10
講演日時：3 月 18 日 16:25～ B 校舎 10 会場

ブタ肝臓水解物におけるアルコール性肝障害予防作用とその活性成分の単離・同定
Isolation of active components from porcine liver hydrolysate for the prevention of liver diseases
○中村 圭佑[1]、植田 一馬[1]、Puspo E. Giriwono[1]、白川 仁[1]、山田 耕太郎[2]、櫻井 英知[2]、駒井 三千夫[1] ([1]東北大・院農・栄養学、[2]ゼリア新薬工業)
○Keisuke NAKAMURA[1], Kazuma UEDA[1], Giriwono PUSPO E.[1], Hitoshi SHIRAKAWA[1], Kotaro YAMADA[2], Hidetomo SAKURAI[2], Michio KOMAI[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Zeria Pharmaceutical Co.,LTD)

【目的】アルコールの過度、および慢性的な摂取は、その分解を行う肝臓に多大な負荷をかけ、肝炎や肝硬変などのアルコール性肝障害を引き起こす一因となる。ブタの肝臓を酵素などで加水分解したブタ肝臓水解物（Porcine liver hydrolysate; PLH）は、多数の肝機能改善作用を有していることが分かっており、肝障害への治療効果が期待される。しかし、現在までに活性物質は特定されておらず、また生体内の作用機構についても詳細には解明されていない。本研究では、アルコール性肝障害モデルラットを用いて PLH による肝障害予防作用を解析し、培養細胞試験により生理活性を示す成分の分離・同定することを目的とした。
【方法】Wistar 系ラット（7 週齢雌性）を 3 日間の市販固形飼料、蒸留水、4 日間の Lieber-DeCarli 組成液体飼料で馴化後、Lieber-DeCarli 組成液体飼料［Con(-)］、または 5%エタノール含有液体飼料に PLH を添加した液体飼料（PLH）、及び無添加の液体飼料［Con(+)］を与え、14 日間飼育した。飼育終了後、解剖に供し血漿および肝臓を採取した。血漿 AST 活性、ALT 活性、8-OHdG、肝臓カタラーゼ（Cat）、スーパーオキシドジスムターゼ（SOD）、グルタチオンペルオキシターゼ（Gpx）活性を測定した。また細胞実験では、PLH をマウスマクロファージ様細胞（RAW264.7）に添加し、一定時間処理した後、リポポリサッカライドによって炎症を誘発させた。その後、定量 RT-PCR を用いて 炎症関連遺伝子（IL-1β、IL-6、TNF-α）の mRNA 量を測定した。次に PLH 溶液を限外濾過膜、イオン交換、逆相カラムで分画し、得られた画分の抗炎症作用について解析した。
【結果】肝障害モデルラットの実験では、Con(+)群に比べ PLH 群の AST・ALT 活性、8-OHdG が有意に低下した。また Cat、SOD、GPx 活性は増加傾向であった。また、RAW 細胞において、PLH で前処理した場合、IL-1β mRNA 量が有意に低下した。また、限外濾過膜により分画した低分子画分の処理によっても、IL-1β mRNA 量の有意な低下が見られた。以上の結果から、PLH はアルコール性肝障害を予防する可能性が示唆された。また抗炎症効果を有しており、低分子領域に抗炎症作用を示す成分の存在が示唆された。

Porcine liver hydrolysate, liver diseases, antiinflammation

講演番号：2B10p11
講演日時：3 月 18 日 16:50～ B 校舎 10 会場

食物アレルギーの経皮免疫療法モデルにおける作用機序の解析
Analysis of mechanisms of epicutaneous immunotherapy in a food allergy model
○森永 真実子[1,2]、平出 恵利華[1,2]、土井 雅津代[3]、北村 紀子[4]、神沼 修[4,5]、廣井 隆親[4]、足立（中嶋） はるよ[1,2]、八村 敏志[1,2]（[1]東大院農生科・応生化、[2]東大院農生科・食の安全研セ、[3]鳥居薬品研究所、[4]東京都医学研・花粉症プロ、[5]山梨大・総合分析実験セ）
○Mamiko MORINAGA[1,2], Erika HIRAIDE[1,2], Katsuyo DOI[3], Noriko KITAMURA[4], Osamu KAMINUMA[4,5], Takachika HIROI[4], Haruyo ADACHI(NAKAJIMA)[1,2], Satoshi HACHIMURA[1,2] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. Tokyo, [2]Res. Cent. Food Safety, Univ. Tokyo, [3]Res. Lab., Torii Pharm. Co., [4]Dept. Genome Med., Allergy Immunol. Proj., Tokyo Metropolitan Inst. Med. Sci., [5]Cent. Life Sci. Res., Univ. Yamanashi)

【目的】食物アレルギーとは、本来生体の維持に必要である食物に対し、不利益な免疫応答が引き起こされる免疫性疾患である。現在、アレルゲンを逆に生体に曝露することで、免疫寛容を誘導し、アレルギーを根治することを目的としたアレルゲン免疫療法の研究が進んでいる。本研究では皮膚からのアレルゲン投与による経皮免疫療法を検討した。卵白食摂取により Th2 型 T 細胞を原因とする腸炎を伴って体重減少が認められる食物アレルギーモデルを用いて、感作後のアレルゲン経皮投与のアレルギー抑制効果とその作用機序を明らかにすることを目的とした。
【方法】BALB/c マウスに卵白アルブミン(OVA)/alum を 2 回腹腔投与し、その後 OVA/PBS 溶液を両耳に塗布する操作により、300 μg ずつ 10 回、3 週間かけてアレルゲン経皮投与を行った。抗原経皮投与に続いて、卵白食を摂取させた。このとき、体重と直腸温の変化、血中抗原特異的 IgE 量、免疫組織より得た CD4+T 細胞の表現型等の指標を検討した。
【結果】アレルゲン経皮投与群では、体重減少および直腸温の降下がアレルゲン非投与群に比べ有意に緩和され、卵白食摂食時の血中抗原特異的 IgE の産生も有意に抑制された。また、脾臓、腸間膜リンパ節由来 CD4+T 細胞において、制御性 T 細胞のマスターレギュレーターである Foxp3 の発現割合がアレルゲン経皮投与群では有意に上昇した。これらの結果から、感作後のアレルゲン経皮投与によって抗原食物摂食時の食物アレルギー反応が抑制された。また、その効果に制御性 T 細胞が関与する可能性が考えられた。

epicutaneous immunotherapy, food allergy, regulatory T cell

講演番号：2B10p12
講演日時：3 月 18 日 17:05～ B 校舎 10 会場

# マウスを用いた卵白タンパク質の経皮感作モデル系の確立と高度化

# Development and refinement of percutaneous sensitization model employing egg white protein in mouse

○小川 昂志、高蓋 秋穂、村上 浩規、岩本 和子、矢野 えりか、財満 信宏、森山 達哉（近大農）
○Takashi OGAWA, Akiho TAKAHUTA, Hiroki MURAKAMI, Kazuko IWAMOTO, Erika YANO, Nobuhiro ZAIMA, Tatsuya MORIYAMA (Kindai Univ.)

**【目的】**近年、食物アレルギーの一部は、皮膚からの抗原侵入と感作が関与していることが明らかになりつつある。そこで本研究では、①マウスモデル系を用いて動物性食物アレルゲンとして代表的な卵白を皮膚に塗布し、そのうちのどのタンパク質が経皮感作しうるのかを、IgE、IgG1 抗体結合タンパク質を検出することで検討した。また、皮膚バリア障害の度合いと経皮感作しやすさの関連性について、共存させる界面活性剤である SDS の濃度を 0.5%と 5%の 2 種類に分け検討した。②さらに、より精密なマウスモデル系の構築を目指し、SDS 濃度 5%条件下において TS(テープストリッピング)の有無、サンプル塗布の回数の変化によって特異的抗体産生量がどのように変化するか検討した。
**【方法】**①BALB/c マウスを 0.5%SDS、5%SDS のみを塗布する群、それぞれの SDS 濃度に 20mg/mL 卵白抽出液を塗布する群の計 4 群を設けた(n=4)。麻酔下でマウスの背中を剃毛した後、TS により角質層を剥離して皮膚バリアを破壊後、サンプルを塗布した。ELISA 法と Western Blotting により、卵白タンパク質に特異的な血清 IgE、IgG1 を検出した。さらに卵白の経口投与による食物アレルギー惹起試験を行い、直腸温の変化を測定した。②BALB/c マウスを TS 有りと無しで週 3 回塗布を行う群、TS 無しで週 5 回塗布を行う群の計 3 群設けた(n=6)。塗布するサンプルは SDS5%、卵白抽出液 20mg/mL とした。2 週間の塗布の後、ELISA 法により卵白タンパク質に特異的な血清 IgE を検出した。
**【結果と考察】**①ELISA 法により卵白を塗布した群において、卵白特異的 IgE 及び IgG1 が検出された。また、Western Blotting により OVA やオボムコイド等の卵白中の複数のタンパク質に特異的な IgE が検出された。SDS 濃度に関しては、0.5%より 5%の方がより早く抗原特異的な IgE が増加した。さらに抗原の経口投与による惹起試験により卵白塗布群において直腸温が有意に低下した。以上より、卵白中の複数のタンパク質が経皮感作することに加え、5%SDS による皮膚バリア機能の破壊が経皮感作のリスクを高めることが示唆された。②ELISA 法により各群の卵白特異的 IgE 濃度を測定した結果、卵白特異的 IgE 濃度は、TS 無しで週 5 回塗布を行う群が最も高く、以下、TS 有りで週 3 回塗布を行う群、TS 無しで週 3 回塗布を行う群の順となった。また、TS 無し群の方が個体差も少なかった。以上より、卵白中のタンパク質の経皮感作において、SDS5%とともに卵白抽出液を塗布した場合、TS は卵白特異的 IgE 抗体の増加に必ずしも必要ではないことが示され、TS 無しでも SDS5%と卵白抽出液の塗布によって、個体差も少なく抗原が効率的に経皮感作しうることが示唆された。

percutaneous sensitization, egg white, allergy

講演番号：2B10p13
講演日時：3 月 18 日 17:20～ B 校舎 10 会場

# ウシ生乳中リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素の精製と酵素学的性質ならびに乳房炎のバイオマーカーとしての検討

# Purification and characterization of bovine lipocalin-type prostaglandin D synthase from cow's raw milk and exploration of the utility as a biomarker for the mastitis

○川井 恵梨佳[1]、田中 充樹[1]、戸田 圭祐[1]、目賀 拓斗[1]、川上 祐生[2]、高橋 吉孝[2]、木本 眞順美[2]、山本 登志子[2]([1]岡山県大院・保健福祉学、[2]岡山県大・保健福祉学・栄養)
○Erika KAWAI[1], Mitsuki TANAKA[1], Keisuke TODA[1], Takuto MEGA[1], Yuki KAWAKAMI[2], Yoshitaka TAKAHASHI[2], Masumi KIMOTO[2], Toshiko SUZUKI-YAMAMOTO[2] ([1]Grad.Sch. Health Welfare Sci., Okayama Pref.Univ., [2]Dept.Nutri.Sci., Okayama Pref.Univ.)

【目的】プロスタグランジン(PG)$D_2$は，アレルギー性炎症の促進因子として働く脂質メディエーターである.乳房炎に罹患した乳牛の牛乳中に高い$PGD_2$合成活性を見出したので,その酵素の精製を行い,ウシ生乳中 PGD 合成酵素の同定と，酵素学的性質の解析を試みた．さらに,生乳中の L-PGDS 酵素活性や含有量を解析し，乳房炎のバイオマーカーとしての有用性を検討した.
【方法】ウシ生乳からホエイタンパク質を調製し，60-80%硫安沈殿画分を採取した．その後，DEAE-Sepharose と phenyl-Sepharose のカラムクロマトグラフィにより,ほぼ均一な酵素タンパク質を精製し，その酵素反応速度を解析した．酵素の特性を知るために，至適 pH，耐熱性，プロテアーゼ抵抗性についても検討した．さらに，精製酵素を標準品として行ったウェスタンブロット解析より生乳中の L-PGDS 含有量を計測し,LC/MS/MS による脂質メタボローム解析により,炎症誘導性脂質メディエーターの含有量を測定した.L-PGDS の含有量と酵素活性を，炎症誘導性脂質メディエーター含有量と比較し，本酵素の乳房炎との相関性について分析した.
【結果と考察】約 1600 倍精製されたウシ生乳由来 L-PGDS(約 27 kDa)を単離し，$PGH_2$に対する $K_m$ 値(37 μM)と比活性(1.4 $\mu mol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$)，至適 pH9.0 を決定した．さらに，精製酵素の部分アミノ酸分析より，本酵素は，シグナルペプチド 28 残基が切断されたウシ L-PGDS と同定された．また，精製酵素は，80℃，10 分間の加熱において，80％以上の活性が維持されていた．加えて，24 時間のペプシンやトリプシンの処理でも活性が維持されており，プロテアーゼ抵抗性を示した．このことから，牛乳を生体内に摂取した後も，L-PGDS は酵素として機能し，$PGD_2$産生に寄与する可能性が考えられる．このことは，乳房炎の牛乳摂取は，アレルギー炎症促進因子である$PGD_2$を多く生体内に取り込む恐れがあり，今後生乳中 L-PGDS/$PGD_2$とアレルギーとの関連についても検討しなければいけない．一方，乳房炎生乳中の脂質メタボローム解析を行ったところ，L-PGDS の含有量は，炎症性脂質メディエーター含有量と一定の相関性を示した．現在，汎用されている簡便な乳房炎指標として，生乳中体細胞数が用いられているが，加齢やストレスによる擬似陽性などの問題点がある．一方，今回報告した L-PGDS は，実験結果から，炎症惹起に関わる脂質メディエーターと高い相関性が確認され，生乳中 L-PGDS のウシ乳房炎早期バイオマーカーとしての有用性が示された.

mastitis, biomarker, bioactive lipid

発表責任者：山本登志子（toshiko@fhw.oka-pu.ac.jp）

講演番号：2B10p14
講演日時：3 月 18 日 17:35～ B 校舎 10 会場

タンパク質ピロール化に関与する内因性低分子化合物の同定
Identification of endogenous protein pyrrolating agents
廣瀬 冴美[1]、○岩田 汐里[1]、日沖 裕介[1]、柴田 貴広[1]、内田 浩二[1,2] ([1]名大院・生命農、[2]東大院・農学生命)
Sayumi HIROSE[1], ○Shiori IWATA[1], Yusuke HIOKI[1], Takahiro SHIBATA[1], Koji UCHIDA[1,2] ([1]Grad. Sch. of Bioagric Sci., Nagoya Univ, [2]Grad. Sch. of Agric. and Lif Sci., The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】自己免疫疾患のひとつである全身性エリテマトーデス(SLE) は、DNA に対して交差性を示す自己抗体の産生が大きな特徴として知られている。当研究室ではこれまでに、SLE 患者およびモデルマウス血清中の自己抗体が DNA のみならず、脂質過酸化由来アルデヒドによって修飾されたタンパク質に対しても交差性を示すことを明らかにしてきた。また、修飾タンパク質が核酸染色試薬である SYBR Green I により認識されることを見いだし、その構造基盤としてタンパク質リジン残基のピロール化を確立した (Miyashita et al., Sci. Rep., 2014)。一方、LC-MS/MS を用いた検討から、生体内にピロールリジンが存在することは立証済みであるが、ピロール化因子の実態は不明である。そこで本研究では、糖質を起源とするピロール化因子の同定を試みた。

【方法・結果】13 種類の糖および糖由来アルデヒドとウシ血清アルブミンを PBS 中 24 時間、37℃の条件で反応させ、糖および糖由来アルデヒド修飾タンパク質を作製した。修飾タンパク質を SYBR Green I 染色したところ、特にグリセルアルデヒド、グリコールアルデヒド(GA) 、メチルグリオキザール修飾タンパク質が SYBR Green I によって強く認識されることを確認した。そこで、同様に作製した修飾タンパク質についてアルカリ加水分解後、安定同位体希釈法を用いた LC-MS/MS によるピロールリジンの検出定量を行ったところ、GA 修飾タンパク質においてのみピロールリジンが有意に検出された。さらに、GA 修飾タンパク質については、GA 濃度依存的に SYBR Green I および自己抗体による認識が増強されることを確認した。以上の結果から、GA が生体内におけるピロール化因子であることが示唆された。

post-translational modification, pyrrolation, aldehyde

講演番号：2B10p15
講演日時：3 月 18 日 17:50～ B 校舎 10 会場

# マクロファージ様細胞によるピロール化タンパク質の取り込み

# Uptake of pyrrolated proteins by macrophage-like cell

柴田 貴広[1]、○平出 直哉[1]、内田 浩二[1,2]（[1]名大院・生命農、[2]東大院・農生科）
Takahiro SIBATA[1], ○Naoya HIRADE[1], Koji UCHIDA[1,2] ([1]Grad. Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ, [2]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】生体内において代謝や疾病に伴って生成される種々の分子によるタンパク質の翻訳後修飾は、生体の状態を反映していると考えられている。こうした翻訳後修飾構造の中には、ダメージ関連分子パターン（DAMPs）としてパターン認識受容体により認識され、炎症応答に関与するものもある。これらのことから、DAMPs の認識機構を明らかにすることは、タンパク質の翻訳後修飾が関与する疾患を理解する上で、極めて重要な意味を持つものと考えられる。これまで当研究室において、SLE モデルマウス由来自己抗体と交差性を示す翻訳後修飾としてタンパク質リジン残基におけるピロール化を見出してきた。そこで本研究では、ピロール化修飾タンパク質の DAMPs としての機能を明らかにするため、マクロファージ様細胞 RAW264.7 による取り込みを検討することとした。
【方法・結果】蛍光標識したヒト血清アルブミン（HSA）に、1,4-butanedial を 24 時間反応させ、蛍光標識ピロール化 HSA を作製した。このピロール化 HSA を RAW264.7 細胞に投与し、蛍光顕微鏡による観察および蛍光強度の測定を行った。その結果、未修飾 HSA と比較して、ピロール化 HSA が有意に取り込まれることを明らかにした。また、脂質ラフト機能阻害剤である methyl-β-cyclodextrin を前処理することにより、ピロール化 HSA の取り込みが減少することも判明した。
以上の結果から、マクロファージにおいてピロール化タンパク質を認識し取り込む機構が存在することが予想された。現在、スカベンジャー受容体による認識機構を中心に、ピロール化タンパク質の DAMPs としての機能を解析している。

post-translational modification, pyrrole, damps

講演番号：2B10p16
講演日時：3 月 18 日 18:05～ B 校舎 10 会場

# 経口免疫寛容により誘導されたアナジー化 T 細胞の網羅的 DNA メチル化解析

Genome-wide DNA methylation analysis of anergic T cell induced by oral tolerance

○豊田 彩乃[1]、古崎 利紀[2]、石井 一夫[2]、服部 誠[1]、好田 正[1]([1]東農工大、[2]東農工大・農学系ゲノム科学人材育成プログラム)

○Ayano TOYODA[1], Toshinori KOZAKI[2], Kazuo ISHII[2], Makoto HATTORI[1], Tadashi YOSHIDA[1] ([1]Tokyo University of Agriculture and Technology, [2]Tokyo University of Agriculture and Technology, Human Resource Development Program in Agricultural Genome Sciences)

【目的】T 細胞のアナジー化は、長期にわたって維持される抗原刺激に対する不応答状態であり、経口免疫寛容の誘導においても重要な役割を果たしている。過去の報告で、T 細胞にアナジーが誘導されることにより複数の遺伝子の発現が特異的に増加することが示されている。我々がこれまでに行なった in vitro で誘導したアナジー化 T 細胞のトランスクリプトーム解析と網羅的 DNA メチル化解析から、アナジー化によって誘導された DNA の脱メチル化が遺伝子の上方発現に関与している可能性が示唆された。そこで、本研究では in vivo で誘導したアナジー化 T 細胞の網羅的メチル化解析を行い、アナジー誘導によって DNA の脱メチル化が促進している遺伝子を探索した。

【方法】卵白アルブミン（OVA）特異的 T 細胞トランスジェニックマウスである DO11.10 マウスに OVA 20%含有飼料を 7 日間自由摂食させることにより T 細胞のアナジー化を誘導した。7 日後、脾臓から T 細胞を精製し、DNA を抽出した。抽出したゲノム DNA をバイサルファイト処理した後、メチル化解析のためのライブラリーを作製し、次世代シーケンサー（Illumina, Genome Analyzer IIx）を用いて各遺伝子の転写開始点の上流 10 kb のシーケンスを解析した。T 細胞のアナジー化は脾臓細胞を抗原の存在下で培養し、サンドイッチ ELISA 法を用いて上清中の IFN-□産生量の低下を指標に判断した。

【結果】シーケンスされたスプライシングバリアントを含む全 35,536 遺伝子の内の約 2.7%にあたる遺伝子のメチル化率がアナジー誘導により変動していた（変動率 0.5 倍以下、または 2 倍以上）。フィッシャーの正確確率検定を用いて有意差（$P<0.05$）のあった遺伝子群（207 個）を DAVID Bioinformatics Resources 6. 7 を用いて機能解析すると、「GTPase, NTPase の活性調節」「細胞内外のシグナル調節」「細胞構造形成の調節」といった機能を持つ遺伝子群のメチル化率が変動していることが明らかとなった。また、スチューデントの t 検定、ウェルチの t 検定、フィッシャーの正確確率検定の 3 つの検定全てで有意差があり、かつ、アナジー誘導によりメチル化率が低下した遺伝子が 25 個存在した。これらの遺伝子の中には in vitro で誘導したアナジー化 T 細胞のトランスクリプトーム解析でアナジー誘導により発現が増加している遺伝子も複数存在した。これらの結果から、経口抗原によって誘導される T 細胞のアナジー化に関連している一部の遺伝子の上方発現にも、エピジェネティックな発現制御機構の一つである DNA の脱メチル化が影響を与える可能性が示唆された。

Oral tolerance, T cell anergy, DNA methylation analysis

講演番号：2C11a01
講演日時：3 月 18 日 09:20～ C 校舎 11 会場

epsilon-Poly-L-lysine 合成酵素（Pls）におけるタンデム縮合ドメインの機能解析
Functional analysis of the tandem condensation domains in poly-L-lysine synthetase
○阿部 修平[1]、吉村 友宏[2]、老川 典夫[1]、山中 一也[1] ([1]関西大・化生工、[2]ＪＮＣ・横浜研)
○Syuuhei ABE[1], Tomohiro YOSHIMURA[2], Tadao OIKAWA[1], Kazuya YAMANAKA[1] ([1]Kansai Univ., [2]JNC Corp.)

【目的】放線菌 *Streptomyces albulus* によって生産される epsilon-Poly-L-lysine（e-PL）は、25-35 残基の L-リジンがイソペプチド結合で繋がった塩基性ホモポリアミノ酸であり、強い抗菌活性を示すことから食品保存料として広く利用されている。我々は、この鎖長分布を有する e-PL が、NRPS 様式で L-リジンを活性化し、アミノ酸リガーゼ様の反応機構でペプチド鎖を伸長するする膜貫通型の新奇ペプチド合成酵素(Sa-Pls)により生合成されることを明らかにしている[1)]。しかしながら、本酵素は膜酵素であるため、*in vitro* での詳細な機能解析はほとんど進んでおらず、特にＣ末端側に位置する３つの相互に相同な縮合ドメイン(C1～C3 ドメイン)におけるペプチド結合形成機構及び鎖長制御機構については未だ不分明な部分が多い。そこで本研究では、Sa-Pls の C1～C3 の各ドメインを、短鎖長(8～19 mer)の e-PL を生合成する放線菌 *S. aureofaciens* USE-82 株由来 Pls(USE-Pls)のドメインと置換した各種キメラ Pls を構築し、*in vivo* で生産される e-PL 鎖長の変化から C1～C3 ドメインの詳細な機能解析を行うことを目的として研究を行った。
【方法と結果】*S. aureofaciens* USE-82 株ゲノムから、degenerate PCR 及びゲノムウォーキングにより USE-*pls* 遺伝子を含む周辺配列約 6.2-kb を取得した。ドメイン解析の結果、USE-Pls は Sa-Pls と同様のドメイン構造を有することが確認されたため、PCR 及びギブソンアッセンブリ―により、Sa-*pls* 遺伝子の C1、C2、又は C3 ドメインコード領域をそれぞれ個別に USE-*pls* 由来のものと置換した各種キメラ *pls* 遺伝子を構築した。これらを pLAE009c ベクターにクローン化した後、*S. albulus* CRM003(Δ*pls*)へ導入し、生産される e-PL の鎖長を HPLC にて分析した。その結果、C3 ドメインの置換は生産物鎖長に影響を与えなかったことから C3 ドメインは鎖長制御には関与しないことが判明した。現在、C1 及び C2 ドメインの置換が生産物鎖長に与える影響についても解析を進めている。

1)：ε-Poly-L-lysine dispersity is controlled by a highly unusual non-ribosomal peptide synthetase. *Nat. Chem. Biol.* 4:766-772.

Poly-amino acid, NRPS, Chimeric enzyme

発表責任者：山中　一也（kazuyay@kansai-u.ac.jp）

講演番号：2C11a02
講演日時：3 月 18 日 09:35～ C 校舎 11 会場

# 微生物二次代謝産物生合成研究をアシストする高効率 TAR 直接クローニング法の開発
# Improved gene cluster direct cloning that facilitates biosynthetic study of natural products

○安田 真央、老川 典夫、山中 一也（関西大・化生工）
○Mao YASUDA, Tadao OIKAWA, Kazuya YAMANAKA (Kansai Univ.)

【目的】微生物は多種多様な生理活性二次代謝産物を生成する能力を秘めているにも関わらず、人工的な培養環境下ではそれらのごく一部しか生産しない。これらの休眠遺伝子群を直接的に化合物生産に結びつける手法として、強制発現プロモーターの導入、制御遺伝子の改変や異種発現などが有効であると考えられる。しかしながら、数十～数百 kb に及ぶ長大な領域にコードされる二次代謝産物生合成に関与する遺伝子群を過不足なく正確にクローン化する技術は極めて限定的であるため、これらの実施に際しては古典的で手間のかかるゲノムライブラリーの構築及びスクリーニング過程が要求される。一方、近年報告された酵母の *in vivo* 相同組換え能を利用した Transformation Associated Recombination(TAR)[1]法では、二次代謝生合成遺伝子群をゲノムから直接、且つ過不足なくベクターへクローニングすることが可能であり、新規生理活性物質探索に極めて有効であることが示されている。しかし、本手法においても、相同組換え過程でクローン化遺伝子を保持しない偽陽性クローンが高頻度で出現するため、本手法を“網羅的”な天然生理活性物質の探索研究手法として応用するには至っていない。そこで本研究では、長大な領域にコードされる二次代謝産物生合成遺伝子群を安定に、且つ煩雑な追加の選抜過程を経ることなくゲノム DNA から高効率で直接クローニングすることが可能な改良型 TAR 法の開発を目的として研究を行った。

【方法と結果】本研究ではクローニングキャパシティーの向上のために、Bacterial Artificial Chromosome(BAC)を骨格とする新規キャプチャーベクター(pCAP hyper-3)を構築し、放線菌由来の各種二次代謝遺伝子の直接クローニングを試みた。線状化した pCAP hyp.3 の末端には *URA3* カウンターセレクションマーカーを導入し(図 1)、TAR 過程で Non Homologous End Joining(NHEJ)の結果生じる偽陽性クローンの出現の抑制を図ったが、クローニング効率は 4%程度であった。線状ベクター末端が欠失した後、自己環化することがその原因と考えられたため、現在ベクター末端に犠牲配列を導入しクローニング効率の向上を目指している。

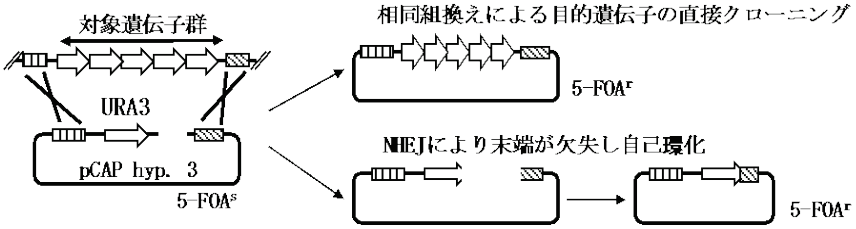


図1 TARによる相同組換えとNHEJによる自己環化

1): Direct cloning and refactoring of a silent lipopeptide biosynthetic gene cluster yields the antibiotic taromycin A (2014) *PNAS* 111：1957-1962

direct cloning, biosynthesis, homologous recombination

発表責任者：山中 一也（kazuyay@kansai-u.ac.jp）

講演番号：2C11a03
講演日時：3 月 18 日 09:50～ C 校舎 11 会場

シロイヌナズナの推定ステロイド生合成酵素の機能解析
Biochemical characterization of putative steroid biosynthesis enzymes in Arabidopsis
○猪野 琢成[1]、山岸 智明[1]、小野寺 桜子[2]、伊藤 友里華[1]、西尾 佳樹[1]、大西 利幸[3]、関本 均[1,2]、横田 孝雄[4]、野村 崇人[1,5] ([1]宇都宮大院農、[2]宇都宮大農、[3]静岡大院農、[4]帝京大バイオ、[5]宇都宮大バイオ)
○Takunari INO[1], Tomoaki YAMAGISHI[1], Sakurako ONODERA[2], Yurika ITO[1], Yoshiki NISHIO[1], Toshiyuki OHNISHI[3], Hitoshi SEKIMOTO[1,2], Takao YOKOTA[4], Takahito NOMURA[1,5] ([1]Grad. Sch. of Agri., Utsunomiya Univ., [2]Fuc. of Agri., Utsunomiya Univ., [3]Grad. Sch. of Agric., Shizuoka Univ., [4]Dept. of Biosci., Teikyo Univ., [5]Ctr. for Biosci. Res. & Educ., Utsunomiya Univ.)

【目的】
様々な植物種から動物が生産するステロイド（プロゲステロンやその還元代謝物等）が検出される。しかしながら、植物におけるそれらステロイドの生合成経路や役割はわかっていない。動物のステロイド生合成酵素遺伝子に類似した遺伝子は植物にも存在する。その中にステロイド 5α-還元酵素と 3β-ヒドロキシステロイド脱水素酵素（3β-HSD）をコードする遺伝子がある。シロイヌナズナには 5α-還元酵素相同遺伝子は 3 つ存在する。そのうち 2 つの遺伝子（*5αH1* および *5αH2* と命名）はドリコール合成酵素をコードしていることが報告されている。残り 1 つは *DET2* 遺伝子であり、植物成長ホルモンであるブラシノステロイドの生合成経路における 5α-還元酵素をコードしていることが明らかにされている。3β-HSD 相同遺伝子はシロイヌナズナに 6 つ存在する。本研究では、それら酵素タンパク質がシロイヌナズナにおいてプロゲステロンの生合成および代謝酵素として機能しているかどうか調べた。

【方法・結果】
シロイヌナズナの 5αH1 と DET2 タンパク質を大腸菌において発現させた。酵素画分とプロゲステロンをインキュベートして、その抽出物を GC-MS 分析した。その結果、DET2 の酵素反応液から 5α-ジヒドロプロゲステロンが検出された。5αH1 の反応液からは検出されなかった。このことから DET2 にはプロゲステロンの 5α-還元活性があることが明らかとなった。
シロイヌナズナの 3β-HSD 相同酵素に関しては、他の 5 つと重複していない 1 つを選び（HSD1 と命名）、同様にタンパク質を発現させて、3β-ヒドロキシステロイドのアロプレグネノロンとインキュベートした。その結果、反応液からプロゲステロンが検出された。
そこで、シロイヌナズナの植物体内でも HSD1 と DET2 はプロゲステロンの生合成および代謝酵素として機能しているのか調べるために、*hsd1* と *det2* 変異体について内生ステロイド分析を行っている。また、*DET2* 遺伝子に関しては過剰発現させたシロイヌナズナの形質転換体を作出して、これら植物体において内生動物ステロイド含量に影響が現れているかを調べている。

steroid, biosynthesis, enzyme

講演番号：2C11a04
講演日時：3 月 18 日 10:05～ C 校舎 11 会場

An unprecedented glutamate epimerase for bacterial peptidoglycan biosynthesis
○Ruoyin FENG[1], Yasuharu Satoh[1], Yasushi Ogasawara[1], Tohru Yoshimura[2], Tohru Dairi[1]
([1]Hokkaido Univ., [2]Nagoya Univ.)

**Background and Object of Research**

Bacterial cell walls contain D-glutamate (D-Glu) as a component of peptidoglycans. In general, D-Glu is synthesized from L-Glu by Glu racemase (MurI, EC 5.1.1.3). In *Bacillus*, D-amino acid aminotransferase (EC 2.6.1.21) supplies D-Glu by transamination from D-alanine to α-ketoglutarate. However, by extensive and detailed bioinformatic analysis, we revealed that *Xanthomonas oryzae* has no orthologs of the Glu racemase and the D-Glu aminotransferase in spite of the fact that *X. oryzae* is prototroph for D-Glu. This fact strongly suggested that the bacterium would have an alternative D-Glu biosynthetic pathway. This research aims to examine the D-Glu biosynthetic pathway in *X. oryzae.*

**Methods and results**

To investigate the genes responsible for D-Glu biosynthesis in *X. oryzae*, we performed shotgun cloning experiments with a D-Glu auxotrophic *Escherichia coli* mutant as host and *X. oryzae* as DNA donor. As the result, we obtained two complementary genes, XOO_1319 and XOO_1320, which are annotated as a hypothetical protein and MurD (UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu synthetase), respectively. By detailed *in vitro* analysis with recombinant enzymes, we revealed that XOO_1320 is an enzyme to ligate L-Glu to UDP-MurNAc-L-Ala for the first example of MurD utilizing L-Glu. In addition, XOO_1319 is a novel enzyme catalyzing epimerization of the terminal L-Glu of the product in the presence of ATP and $Mg^{2+}$.

peptidoglycan, *Xanthomonas oryzae*, D-Glutamate biosynthesis

発表責任者：大利徹（dairi@eng.hokudai.ac.jp）

講演番号：2C11a05
講演日時：3 月 18 日 10:20～ C 校舎 11 会場

# 放線菌に見出されたペプチドリガーゼオルソログの機能解析

Characterization of novel peptide ligase orthologs in actinomycetes

○藤村 祐子、小笠原 泰志、大利 徹（北大工）
○Yuko FUJIMURA, Yasushi OGASAWARA, Tohru DAIRI (Hokkaido Univ.)

**研究背景）**当研究室ではペプチド系抗生物質フェガノマイシンのペプチド結合形成を触媒する新規のペプチドライゲース（PGM1）を見出した。（Noike et al *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 71.）PGM1 はアミジノフェニルグリシンのカルボキシル基をアデノシン三リン酸（ATP）存在下でリン酸無水物へと活性化し、リボソームによって生合成されたペプチドを求核剤として用いてペプチド結合形成反応を触媒する。PGM1 はペプチドを求核剤に用いる初めての酵素であり、またリボソームとそれ以外の機構が協同してペプチドの基本骨格を形成する初めての例でもある。我々はペプチドライゲースの一般性と多様性について興味を持ち、NCBI データベースに対して BLAST を用いた相同性検索を行った。その結果、放線菌を中心に多数の微生物からそのオルソログを見いだすことができ、その多くは他の遺伝子群とクラスターをなしていた。

**方法・結果）** ゲノム中にオルソログが見出された 2 つの菌株（*Catelliglobosispora koreensis*, *Nocardiopsis baichengensis*）のゲノムを鋳型とし、オルソログを含む推定生合成遺伝子クラスターを PCR で増幅後ベクターにクローニングし、それぞれ近縁異種宿主である *Streptomyces lividans* または *Streptomyces albus* に導入した。形質転換株の培養上清を HPLC で分析し、特異的に生産される化合物を探索した結果、*C. koreensis* の遺伝子クラスター導入株、*N. baichengensis* の遺伝子クラスター導入株でいずれも 1 つの特異的なピークが観測された。LC/MS 解析により、前者のピークは分子量 584、後者のピークは分子量 213 と推定された。現在、それら化合物の精製および、NMR と高分解能質量分析による構造解析を行っている。

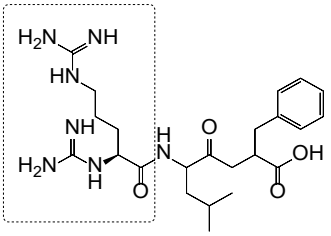
peptide ligase, heterologous expression, biosynthesis

講演番号：2C11a06
講演日時：3 月 18 日 10:45～ C 校舎 11 会場

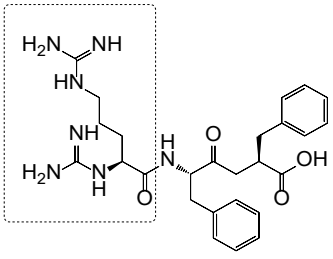
ケトメミシンの生合成に関わるアミジノ基転移酵素の機能解析
Characterization of three amidinotransferases involved in the biosynthesis of ketomemicins
○小笠原 泰志、藤盛 道子、川田 純平、大利 徹（北大工）
○Yasushi OGASAWARA, Michiko FUJIMORI, Junpei KAWATA, Tohru DAIRI (Hokkaido Univ.)

**研究背景）**我々は最近、放線菌が生産するペプチド系抗生物質フェガノマイシンの生合成に関与する新規なペプチド結合形成酵素、ペプチドライゲース（PGM1）を見出した。PGM1 は N 末基質のカルボキシル基を ATP の存在下でリン酸無水物へと活性化し、ここに C 末基質のオリゴペプチドが求核攻撃することでペプチド結合形成の反応を触媒する。本酵素は C 末基質に対する基質認識が緩く、様々な基質を求核剤として用いることができる点で興味深い。さらに我々はこのオルソログの酵素がレゾルシノマイシンやケトメミシンの生合成に関わっていることも見出している。これら一連のライゲースは、いずれも N 末基質に *N*α–アミジノアミノ酸を用いるが、その生合成については各遺伝子クラスター中にコードされているアミジノ基転移酵素が関わると考えられた。そこで、我々は 3 種の放線菌から見出されたケトメミシン類の生合成に関わるアミジノ基転移酵素の機能解析を行った。

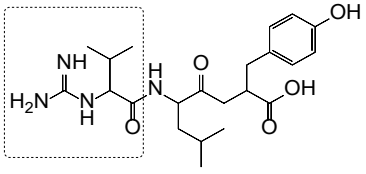
**方法・結果及び考察）**一般的にアミジノ基転移酵素は、アミジノ基を供与体であるアルギニンから受容体基質に転移する反応を触媒する。ケトメミシンの生合成遺伝子クラスターのアミジノ基転移酵素について組換え酵素を用いて検証した結果、*Micromonospora* sp. および *Streptomyces mobaraensis* 由来の酵素では 2 分子のアルギニンからアミジノアルギニンの生成が確認できた。また *Salinispora tropica* 由来の酵素ではバリンをアミジノ基受容体としてアミジノバリンが生成することが分かった。また、アミジノ受容体基質に対する基質特異性を検討したところ、前者 2 つの酵素では基質を厳密に認識するのに対して、最後者の酵素は本来の基質に加えてロイシン、イソロイシン、メチオニンなど複数のアミノ酸も認識した。



ketomemicin A
(*Micromonospora* sp.)



ketomemicin B3
(*S. mobaraensis*)



ketomemicin C
(*S. tropica*)

Y. Ogasawara et al *Bioorg*. *Med*. *Chem*. *Lett*. **2016**, *26*, 3662.

amidinotransferase, peptide ligase, biosynthesis

講演番号：2C11a07
講演日時：3 月 18 日 11:00～ C 校舎 11 会場

新規メナキノン生合成経路阻害剤の探索
Isolation and structural determination of futalosine pathway specific inhibitors
○近藤 憲介、小笠原 泰志、原田 立夏子、池田 安由美、大利 徹（北大工）
○Kensuke KONDO, Yasushi OGASAWARA, Rikako HARADA, Ayumi IKEDA, Tohru DAIRI (Hokkaido Univ.)

**【研究背景】**メナキノンは人間にとっては血液凝固に必須なビタミン（ビタミン K）であり、また微生物では電子伝達系の補酵素として生育に必須な物質である。大腸菌や枯草菌におけるメナキノンの生合成は、コリスミ酸から *o*-スクシニル安息香酸を経る経路が既に明らかにされている。当研究室では、胃がんの原因として知られているピロリ菌を含む一部の微生物において、既知経路とは異なる全く新規な経路（フタロシン経路）でメナキノンを生合成することを見出している。乳酸菌などの有用腸内細菌は既知経路でメナキノンを生合成することから、フタロシン経路の特異的阻害剤はピロリ菌に選択的に働く新規の抗生物質になると期待される。本研究では放線菌やカビの培養物からフタロシン経路阻害剤の探索を行い、候補化合物の単離および構造決定を行った。

**【方法・結果及び考察】**阻害剤のスクリーニングにおいて、当研究室ではピロリ菌を扱うことができない。そこで互いに近縁の 2 種のバチルス属細菌を用いてフタロシン経路阻害剤のスクリーニングを行った。*Bacillus subtilis* は既知経路でメナキノンを生合成するのに対して、*Bacillus halodurans* はフタロシン経路でメナキノンを生合成する。そこで両菌株を被検菌に用い、*B. subtilis* には活性を示さず *B. halodurans* には生育阻止活性を示すサンプルを探索した結果、複数の候補サンプルを見出すことができた。さらにメナキノン添加による生育回復アッセイを行うことで、実際にフタロシン経路を阻害しているサンプルのみを絞り込んだ。候補サンプルの内、放線菌の培養物の一つについて、その活性本体を溶媒抽出と各種クロマトグラフィー等で単離、精製した。さらに MS 及び各種 NMR スペクトルの解析から活性本体の構造を決定した。続いて得られた活性本体による *B. halodurans* の生育阻害が、フタロシン経路の中間体である 1,4-naphthoquinone-6-carboxylic acid（NQCA）により回復できなかったことから、本化合物は NQCA より下流のメナキノン生合成経路を阻害することを明らかにできた。

本研究の一部は、浦上食品・食文化振興財団からの助成を受けて実施しました。

menaquinone biosynthesis, futalosine pathway, inhibitor

講演番号：2C11a08
講演日時：3 月 18 日 11:15～ C 校舎 11 会場

# Analysis of secondary metabolites in plasmidless mutants of *Streptomyces rochei* 7434AN4

○Yosi NINDITA[1], Kuninobu INADA[2], Haruyasu KINASHI[1], Kenji ARAKAWA[1] ([1]Department of Molecular Biotechnology, Graduate school of AdSM, Hiroshima University, [2]N-BARD, Hiroshima University)

*Streptomyces rochei* 7434AN4 carries three linear plasmids, pSLA2-L (211 kb), pSLA2-M (113 kb), and pSLA2-S (18 kb). Genome project on this strain, that has been recently completed, revealed that the chromosome was found to be 8.36 Mb in size and carries more than 34 biosynthetic gene clusters. Previous study showed that plasmidless mutants of this strain (2-39, YN-P7, and YN-P145) had lost their chromosomal telomere concomitant to the plasmid loss. Each of the plasmidless mutants has various size of chromosomal telomere deletion and shows different phenotype when cultivated on agar media.

In order to compare the metabolites production profile of plasmidless mutants, each strain was cultivated in different medium (YM, R1M, and oatmeal medium). Secondary metabolites were extracted using ethyl acetate and analyzed by TLC and HPLC. Each strain exhibit different metabolites profiles compared to those of the wild type. It is noteworthy that strain YN-P145 showed additional UV-active spots when grown in oatmeal medium. These UV-active compounds were purified using Sephadex LH-20 and silica gel chromatographies. The UV-active compound named YN-P145A has molecular formula of $C_{14}H_{16}N_2O_2$ and was characterized to be cyclo(Phe-Pro), a cyclodipeptide that known to have an antifungal activity. Biosynthesis of cyclo(Phe-Pro) will be further described. The main UV-active compound from YN-P145, YN-P145B, has been purified and further analyses of this compound will be described.

*Streptomyces*, metabolites, circularized chromosome

発表責任者：Yosi Nindita（ynindita@gmail.com）

講演番号：2C11a09
講演日時：3 月 18 日 11:30～ C 校舎 11 会場

# 放線菌 *Streptomyces rochei* の抗生物質生産誘導シグナル分子 SRB の生合成経路の網羅的解析

Comprehensive analysis of biosynthetic pathway of SRB molecules that induce antibiotic production in *Streptomyces rochei*

○手島 愛子、波多江 希、津田 直人、謝 麗、河原 弘幸、木梨 陽康、荒川 賢治 (広島大院・先端研)
○Aiko TESHIMA, Nozomi HADAE, Naoto TSUDA, Li XIE, Hiroyuki KAWAHARA, Haruyasu KINASHI, Kenji ARAKAWA (Hiroshima Univ.)

【目的】放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株は、抗生物質ランカサイジン(LC)およびランカマイシン(LM)を生産し、それらの生合成はシグナル分子 *Streptomyces rochei* butenolide (SRB)により厳密に制御されている。培養初期には SRB レセプターSrrA が転写活性化因子 *srrY* の上流に結合して転写抑制が行なわれている。培養中期になると SRB 合成酵素 SrrX が SRB を合成し、本分子が SrrA と結合する。その結果 SRB-SrrA 複合体が遊離し、 *srrY* の転写が開始されることで LC 及び LM 生産が誘導される。

当研究室ではこれまでに SRB1 および SRB2 の化学構造を決定している。*Streptomyces* 属放線菌の約 60%はγ-ブチロラクトン型シグナル分子を有していると推察されているが、SRB はブテノライド型分子であり、γ-ブチロラクトン型分子との比較も含めその生合成経路に興味が持たれた。*S.rochei* の SRB 合成遺伝子 *srrX* 近傍にはデヒドロゲナーゼ遺伝子 *srrG*, SRB リセプター遺伝子 *srrA*, ホスファターゼ遺伝子 *srrP*, P450 水酸化酵素遺伝子 *srrO* などがコードされている。これまでに *srrO* 単独破壊株が LC・LM を生産し、そのシグナル分子は 6'-deoxo-SRB であることを見出している。すなわち、*srrO* の 6'位酸化反応への関与を明らかにした。今回、新たに *srrP, srrG* の SRB 合成への関与を調べ、さらに網羅的遺伝子破壊及び共培養実験を駆使した SRB 生合成経路の解析も試みた。

【方法および結果】*srrP* は、SRB 生合成においてブテノライド骨格の 2,3 位二重結合または 5 位メチル基形成に関与すると考えられる。そこで、*srrP* 領域の相同的組み換えによる遺伝子破壊を行った。*ΔsrrP* 株の代謝産物解析を行ったところ、LC・LM を生産していなかった。SRB の存在により LC・LM 生産が回復するか確かめるために SRB 生産菌 *ΔsrrY* 株と共培養を行ったところ、LC・LM を生産した。このことから *srrP* は SRB 合成に関与していることが明らかとなった。

SRB 生合成経路の解明を目指し、LC・LM 非生産の遺伝子破壊株 *ΔsrrP, ΔsrrG, ΔsrrX* を用い実験を行った。まず SRB 標品を添加培養したところ、我々の予想と反して *ΔsrrX* 株に対してのみ LC・LM 生産の回復が見られた。さらに、遺伝子破壊株を網羅的に共培養した結果を考え合わせると、*ΔsrrP, ΔsrrG* において SRB 中間体の蓄積が示唆され、共培養で相補することによって LC 生産が回復したと考えられた。

biosynthesis, regulatory gene, secondary metabolite

講演番号：2C11a10
講演日時：3 月 18 日 11:45～ C 校舎 11 会場

# 放線菌 *Streptomyces rochei* の多重変異株が生産するアゾキシアルケン化合物 KA57-A の生合成機構

# Biosynthetic investigation of azoxyalkene compound KA57-A produced by a multiple gene disruptant of *Streptomyces rochei*

○岸本 拓也[1]、國武 博文[1]、NINDITA Yosi[1]、木梨 陽康[1]、福本 敦[2]、安齊 洋次郎[2]、荒川 賢治[1]（[1]広島大院・先端研、[2]東邦大学・薬学部）

○Takuya KISHIMOTO[1], Hirofumi KUNITAKE[1], Yosi NINDITA[1], Haruyasu KINASHI[1], Atsushi FUKUMOTO[2], Yojiro ANZAI[2], Kenji ARAKAWA[1] ([1]Grad. Sch. AdSM, Hiroshima Univ., [2]Faculty of Pharmaceutical Sci., Toho Univ.)

【目的】

放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株は、通常培養において２つのポリケチド抗生物質ランカサイジン（LC）およびランカマイシン（LM）を生産する。LC・LM 生合成遺伝子および転写リプレッサー遺伝子 *srrB* に変異を加えた三重破壊株(*ΔsrrB ΔlkmE ΔlkcF-KR1*) では通常非生産のアゾキシアルケン化合物 KA57-A の生産が確認でき、遺伝子工学による休眠二次代謝の覚醒に成功した。本化合物はアゾキシ結合を有しており、近年アゾキシアルケン化合物 (maniwamycin) において Quorum Sensing 阻害活性を示した報告がされており、生合成や生理活性の観点から大変興味深い。

【方法・結果】

KA57-A は $C_{10}H_{20}N_2O_3$ のアゾキシアルケン化合物であり、Quorum Sensing 阻害活性を測定した結果、クロモバクテリウム・ビオラセウムを $IC_{50}$＝500 μg/ml の濃度で阻害することが分かった。標識酢酸やアミノ酸などの取込実験の知見から本化合物は、 ①Hexylamine と Serine の縮合, ②酢酸 C-2 位由来の増炭反応, ③C-3 位の脱リン酸を介した C-3, 4 位での二重結合の形成, ④C-4 位での還元･脱水反応, ⑤C-1', 2'位での二重結合の形成, という一連の流れで生合成されることがわかった。また、次世代シークエンサー解析を行ったところ、*S. viridifaciens* 由来のアゾキシ化合物 valanimycin 生合成クラスター (*vlm*)と高い相同性を示すクラスターが *S. rochei* 染色体上に検出できた。そこで KA57-A 生合成経路において Hexylamine と Serine の縮合反応に関与する *azxA* 遺伝子の破壊株を構築し代謝産物解析を行ったところ、本遺伝子産物の生合成への関与が明らかになった。本発表では *azxA* 遺伝子破壊株に加え、キナーゼ、酸化還元酵素などの遺伝子破壊株の代謝産物解析についても報告する。

*Streptomyces*, secondary metabolite, azoxyalkene

発表責任者：荒川賢治（karakawa@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：2C11p01
講演日時：3 月 18 日 14:00～ C 校舎 11 会場

Streptothricin 生合成遺伝子を利用した β-lysine oligopeptide 生産菌の構築
Generation of a strain producing β-lysine-oligopeptide using streptothricin biosynthetic genes
○川崎 春香、丸山 千登勢、濱野 吉十（福井県大生物資源）
○Haruka KAWASAKI, Chitose MARUYAMA, Yoshimitsu HAMANO (Fukui Pref. Univ.)

**【目的】**放線菌 *Streptomyces rochei* NBRC12908 が生産する抗生物質 streptothricin（ST）は、その構造に 1～4 残基からなる β-lysine oligopeptide [oligo(β-Lys)]を有している。これまでの生合成研究において、oligo(β-Lys) 構造が、3 つの非リボソーム型ペプチド合成酵素、Orf5（A domain）、Orf19（A domain）、Orf18（T, C domain）によって合成されることを明らかにしている。(Maruyama, C. *et al.*, *Nature chemical Biology,* 8,791-797, 2012）また、L-α-lysine から L-β-lysine へのアミノ基転移反応が Orf15（L-lysine-2,3-aminomutase）によって触媒されることを見出し、本酵素遺伝子を発現させた放線菌 *Streptomyces lividans* TK23 において、L-α-lysine から L-β-lysine への変換反応が可能であることも明らかにした。しかしながら L-β-lysine のような低分子化合物を培養液から単離精製することは非常に困難である。そこで本研究では、上記の 4 つの遺伝子を含む変異型 ST 生合成遺伝子クラスターを用いて oligo(β-Lys) 生産菌の分子育種を行い、L-β-lysine をオリゴマーとして単離する方法を確立した。
**【方法と結果】**ST は、oligo(β-Lys) と生合成中間体である streptothrisamine との縮合により生合成される。そこで、微生物による oligo(β-Lys) 生産を目的に、streptothrisamine 生合成遺伝子を破壊した遺伝子クラスターを構築し、異種放線菌 *Streptomyces lividans* TK23 株に導入した。得られた形質転換体の培養上清を LC-MS にて分析したところ、ほぼ全ての導入株（約 50 株）において oligo(β-Lys) の菌体外生産を確認できなかったが、1 株が菌体外に oligo(β-Lys) を生産することを見出した。本導入株は、細胞内で生合成された oligo(β-Lys) を細胞外に排出する能力が向上した自然突然変異株であると考えられたことから、本変異株からプラスミドをキュアリングし、再度、プラスミドを導入した。その結果、oligo(β-Lys) の菌体外生産を再び確認することができた。また当研究室にてこれまでに確立した、強アニオン化合物テトラフェニルボレートを用いた簡便なポリカチオン性化合物単離精製法を用いて、oligo(β-Lys)の単離精製を試みたところ、興味深いことに培養上清だけでなく菌体表層にも同等量の oligo(β-Lys)が吸着していたことが明らかになった。L-β-lysine を初めとする β-アミノ酸は、医薬品の合成原料として利用されることから、その効率的な発酵生産は非常に重要である。そこで oligo(β-Lys)の生産性向上を目指して L-α-lysine の添加培養を行ったところ、oligo(β-Lys)の生産性が向上した。すなわち、出発物質となる L-α-lysine の供給量の強化は oligo(β-Lys)の生産性向上に寄与することが判明した。そこで現在、リジン生合成経路の強化によって oligo(β-Lys)生産性が向上するか検証しており、その結果についても報告する。

β-amino acid, L-β-lysine

発表責任者：濱野吉十（hamano@fpu.ac.jp）

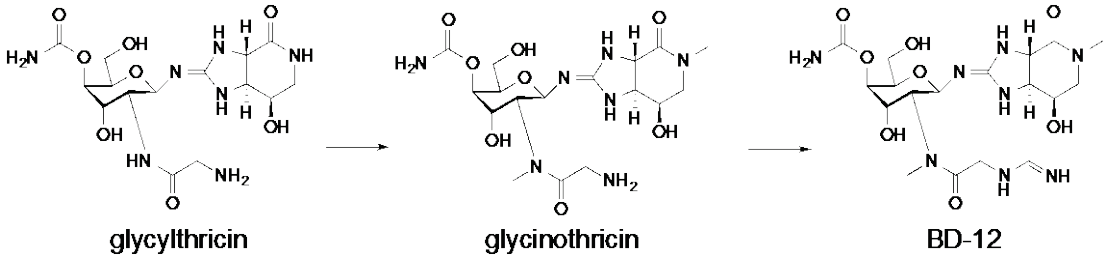
講演番号：2C11p02
講演日時：3 月 18 日 14:15～ C 校舎 11 会場

BD-12 生合成における *N*-formimidoyl 基転移酵素の酵素学的諸性質
Enzymatic properties of *N*-formimidoyl synthase in the BD-12 biosynthesis

○新倉 春香[1]、丸山 千登勢[1]、小笠原 泰志[2]、大利 徹[2]、濱野 吉十[1] ([1]福井県大・生物資源、[2]北大・工)
○Haruka NIIKURA[1], Chitose MARUYAMA[1], Yasushi OGASAWARA[2], Tohru DAIRI[2], Yoshimitsu HAMANO[1] ([1]Fukui Pref. Univ., [2]Hokkaido Univ.)

**【目的】**抗生物質 BD-12 は streptothricin（ST）類抗生物質の 1 つであり、放線菌 *Streptomyces luteocolor* NBRC 13826 によって生産される[1)]。その化学構造の特徴は、*N*-formimidoyl-glycine 側鎖であり、生合成中間体である glycylthricin [2)]および glycinothricin を経由して生合成されることが考えられる。BD-12 生合成遺伝子クラスター中に見出した Orf 1 は、*N*-formimidoyl 基転移酵素[3)]に相同性を示したことから、これら生合成中間体を基質に *N*-formimidoyl 基を導入すると考えられた。そこで、本研究では、本酵素遺伝子の破壊による生合成中間体の同定および本酵素の酵素学的諸性質の解明を行った。

**【方法と結果】***orf 1* 遺伝子を破壊した BD-12 生合成遺伝子クラスターを異種放線菌に導入したところ、その導入株が生合成中間体 glycinothricin を生産することを LC/MS および NMR 解析によって確認した。そこで組換え Orf 1（rOrf 1）を構築し、本化合物を基質とした酵素反応を行った。*N*-formimidoyl 基転移酵素は、フラビン酵素であることが知られているが[3)]、大腸菌で発現した rOrf 1 に FAD との結合は観察されず、酵素活性も検出することはできなかった。そこで、rOrf 1 を異種放線菌で発現させたところ、その精製酵素はフラビン酵素に特徴的な UV 吸収を示したことから、活性型酵素として発現していることが示唆された。そこで、glycinothricin を基質とした酵素反応を行い、その反応液を HPLC/ESI-MS で分析したところ、BD-12 の分子量 486 に一致する化合物の生成を観察し、本酵素の *N*-formimidoyl 化活性を検出することができた。さらに、本酵素の基質特異性を調べたところ、glycinothricin 以外にも β-lysine 側鎖を有する ST が基質となることが判明したことから、これら基質を用いた反応速度論的解析の結果についても報告する。




**【文献】**1) Furumai, T. *et al., J. Antibiot.* **21**, 283-289, 1968.
2) Maruyama, C. *et al., Appl. Environ. Microbiol, 82, 3640*, 2016.
3) Dairi, T. *et al., Mol. Gen. Genet*. **236**, 49-59, 1992.

*N*-formimidoyl synthase, flavoprotein, FAD

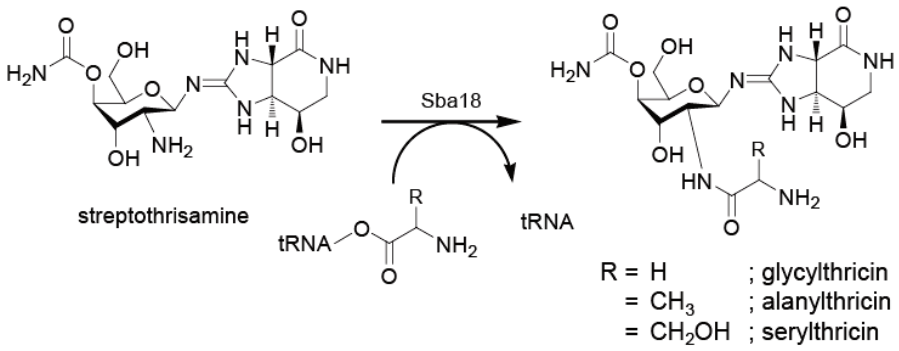
発表責任者：濱野吉十（hamano@fpu.ac.jp）

講演番号：2C11p03
講演日時：3 月 18 日 14:30～ C 校舎 11 会場

# streptothricin 類縁生合成遺伝子群に見出した aminoacyl-tRNA 依存型ペプチド合成酵素の機能解析
# Functional analysis of an aminoacyl-tRNA-dependent peptide synthase from the biosynthetic gene cluster responsible for a streptothricin-related compound

○松田 貫暉[1]、丸山 千登勢[1]、橋本 絢子[2]、新家 一男[3]、濱野 吉十[1]([1]福井県大・生物資源、[2]JBIC、[3]産総研)
○ Kanki MATSUDA[1], Chitose MARUYAMA[1], Junko HASHIMOTO[2], Kazuo SHIN-YA[3], Yoshimitsu HAMANO[1] ([1]Fukui Pref. Univ., [2]JBIC, [3]AIST)

**【目的】**抗生物質 BD-12 は、streptothricin（ST）類縁化合物である。その生合成中間体である glycylthricin は側鎖に glycine を有しており、アミノ糖と glycine 側鎖のペプチド結合形成は、FemAB family に相同性を示す Orf11 によって Gly-tRNA$^{Gly}$ 依存的に触媒される（C. Maruyama *et al*., *Appl. Environ. Microbiol.*, 82, 3640-3648, 2016）。したがって、基質特異性の異なる Orf11 ホモログ酵素の遺伝子探索は、glycine 以外のアミノ酸を側鎖に有する新規 ST 類縁化合物の創製に有用であると考えられる。そこで、放線菌ゲノムデータベースよりホモログ遺伝子を探索したところ、新たな ST 類縁生合成遺伝子群（*sba* 遺伝子群）から、*sba*18 遺伝子を同定した。Sba18 組換え酵素を構築し、大腸菌由来の aminoacyl-tRNA（aa-tRNA）を用い、*in vitro* にて本酵素の基質特異性を調べたところ、Gly-tRNA$^{Gly}$ だけでなく、Ala-tRNA$^{Ala}$、Ser-tRNA$^{Ser}$ を基質として認識し、alanine、serine を側鎖に有する新規 ST 類縁化合物、alanylthricin、serylthricin を生成した。そこで本研究では、酵素合成で得られたこれら新規化合物の生理活性を評価し、さらに、これら化合物の生産菌の構築を試みた。




**【方法と結果】***E. coli* W3110 を被検菌とした抗菌活性を評価したところ、*in vitro* の酵素反応にて合成できた alanylthricin および serylthricin は、抗菌活性を示す生理活性物質であることが判明した。より詳細な活性評価に大変興味が持たれたが、現在のところ、これら化合物は酵素合成でしか得ることができない。そこで、著量の化合物を得るために、当研究室で構築している ST 生合成中間体 streptothrisamine 生産放線菌に *sba*18 遺伝子を導入した共発現株を構築した。共発現株は glycylthricin、alanylthricin、serylthricin の 3 化合物を生産すると考えられたが、予想に反し、glycylthricin のみ生産した。すなわち、Sba18 は、大腸菌由来の aa-tRNA においては比較的広い基質特異性を示すが、放線菌由来では Gly-tRNA$^{Gly}$ に高い基質特異性を示すことが示唆された。現在、放線菌由来の tRNA を用いた *in vitro* の酵素反応にて基質特異性を調べており、それら結果についても報告する。

peptide synthase, aminoacyl-tRNA

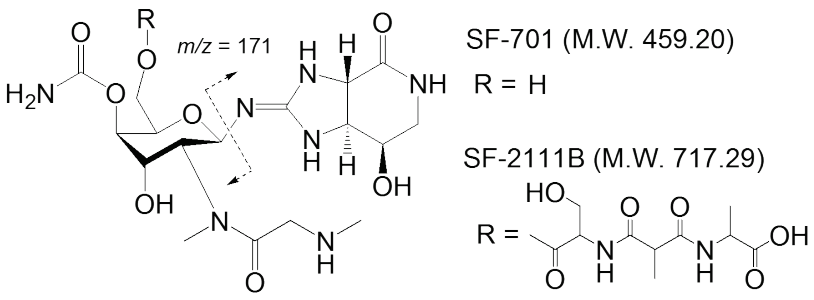
発表責任者：濱野吉十（hamano@fpu.ac.jp）

講演番号：2C11p04
講演日時：3 月 18 日 14:45～ C 校舎 11 会場

*O*-acyl peptide 構造を有する streptothricin 類縁化合物の生合成
Biosynthesis of a streptothricin analogue possessing *O*-acyl peptide

○丸山 千登勢[1]、橋本 絢子[2]、新家 一男[3]、濱野 吉十[1] ([1]福井県大生物資源、[2]JBIC、[3]産総研)
○ Chitose MARUYAMA[1], Junko HASHIMOTO[2], Kazuo SHIN-YA[3], Yoshimitsu HAMANO[1] ([1]Fukui Pref. Univ., [2]JBIC, [3]AIST)

**【目的】**当研究室ではこれまでに、抗生物質 Streptothricin（ST）およびその類縁化合物 BD-12 の生合成機構を明らかにしている。これら化合物は、共通する生合成中間体 streptothrisamine を経由して生合成されることから、streptothrisamine 生合成遺伝子を指標としたホモログ遺伝子クラスターの探索は、新規 ST 類化合物の探索に有用であると考えられる。そこで、放線菌ゲノムデータベースよりホモログ遺伝子を探索したところ、*Streptomyces* sp. SF-2111 にホモログ遺伝子を見出した。本菌株は、ST 類縁化合物である SF-701 および SF-2111 を生産することが知られていたことから、これら化合物の生合成遺伝子クラスター（*sbb* 遺伝子クラスター）であると考えられた。さらにこれに加え、*sbb* 遺伝子クラスターに相同性を示す *sbc* 遺伝子クラスターを *Streptomyces* 属放線菌から見出した。SF-2111 は、特徴的な *O*-acyl peptide 構造を有しており、その生合成機構は大変興味深い。また、*sbc* 遺伝子クラスターに含まれる遺伝子やその配置は、*sbb* 遺伝子クラスターとよく一致した。そこで、本研究では、*sbc* 遺伝子クラスターの機能解析を行った。




**【方法と結果】***Streptomyces* 属放線菌のゲノム DNA より BAC ライブラリーを構築し、PCR スクリーニングによって *sbc* 遺伝子クラスターを含む BAC クローンを取得した。得られた BAC クローンを異種放線菌 *S. lividans* TK23 に導入し、その形質転換体の培養液を LCMS にて分析したところ、ST 類縁化合物に共通するフラグメントピークである *m/z* =171 を示す複数の化合物が検出された。これら化合物の高分解能 MS スペクトルが *Streptomyces* sp. SF-2111 が生産する SF-701 および SF-2111B によく一致したことから、*sbc* 遺伝子クラスターも SF-701 および SF-2111B の生合成遺伝子であることが判明した。*sbc* 遺伝子クラスターは、機能未知の非リボソーム型ペプチド合成酵素遺伝子（NRPS 遺伝子）を複数有しており、これらが SF-2111B の特徴的な *O*-acyl peptide 構造の生合成に関与していると推測された。本発表では、これら NRPS の機能についても紹介する。

NRPS, peptide

発表責任者：濱野吉十（hamano@fpu.ac.jp）

講演番号：2C11p05
講演日時：3 月 18 日 15:00～ C 校舎 11 会場

# 粘液細菌抗生物質 cystothiazole A の異種発現とその生産性
# Heterologous Production of Cystothiazole A and Its Productivity

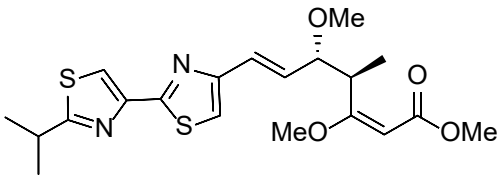
○山崎 達志、鈴木 彰、柘植 尚志、小鹿 一 (名大院生命農)
○Satoshi YAMZAKI, Akira SUZUKI, Takashi TSUGE, Makoto OJIKA (Nagoya Univ.)

【背景・目的】

難培養性微生物である粘液細菌はδ-プロテオバクテリアに属するグラム陰性桿菌であり、細菌の中では放線菌と並んで最大クラスのゲノムサイズをもつ。粘液細菌からはこれまでに 100 種以上の基本骨格をもつ新規性の高い二次代謝産物が発見されていることから、新規で多様な二次代謝関連遺伝子を保有していると考えられる。Cystothiazole A は粘液細菌 *Cystobacter fuscus* から単離された抗真菌性化合物で、我々はこれまでに *C. fuscus* の BAC ライブラリーを構築し、cystothiazole A 生合成遺伝子クラスター全長を含むクローンを取得することに成功している。[1)]本研究では、生合成遺伝子クラスターの異種発現および異種発現株による cystothiazole A の生産性向上を目的とした。

【方法・結果】

Cystothiazole A 生合成遺伝子クラスター全長を含む BAC クローンのベクター部分に異種発現宿主ゲノム断片を挿入し、エレクトロポレーションにより宿主 *M. xanthus* に導入し、異種発現株を得た。*C. fuscus* 用の生産培地で 4 日間培養後、その培養物を分析したところ cystothiazole A の生産が確認された。元の生産者である *C. fuscus* の cystothiazole A の生産量は 0.47 mg/L broth であったが、異種発現株で 3.5 mg/L broth と *C. fuscus* の約 7 倍に向上した。一方、二次代謝産物の生産性を高めるためによく用いられる吸着樹脂添加条件では異種発現株の生産性は 3.6 mg/L broth と変化せず、*C. fuscus* の 15 mg/L broth に比べて約 1/4 となり、生産性の向上は達成されていない。そこで、宿主 *M. xanthus* が遺伝子操作可能な点に着目し、遺伝子工学的な手法によって cystothiazole A 生産量の増加を目指すこととした。すなわち、ある PKS 遺伝子を破壊すると、その他の PKS 化合物の生産が増加するという報告を参考に、*M. xanthus* 異種発現株が生産する cystothiazole A 以外の PKS または NRPS 化合物の生合成遺伝子を破壊することで cystothiazole A の生産量を向上させるべく研究を進めている。



cystothiazole A

1) 鈴木　彰ら、粘液細菌抗真菌物質 cystothiazole A の生合成遺伝子の異種発現, 日本農芸化学会 2008 年度大会 (名古屋、2008).

myxobacteria, heterologous expression, biosynthetic gene cluster

講演番号：2C11p06
講演日時：3 月 18 日 15:25～ C 校舎 11 会場

# 培養地衣菌由来のβ-オルシノール系ポリケチド合成酵素遺伝子の解析

# Studies on the polyketide synthase gene for β-orcinol depsidones from lichen mycobiont culture

○近藤 博暉[1]、原 光二郎[1]、川上 寛子[1]、山本 好和[2]、小峰 正史[1]([1]秋田県大院・生資科、[2]大阪自然史博)
○Hiroki KONDO[1], Kojiro HARA[1], Hiroko KAWAKAMI[1], Yoshikazu YAMAMOTO[2], Masashi KOMINE[1] ([1]Akita Pref. Univ., [2]Osaka Mus. Nat. Hist.)

【背景・目的】

地衣類は菌類と藻類が共生する生物で地衣成分と呼ばれる独特な二次代謝産物を産生する。多様な薬理活性を持つため、新規医薬品などへの応用が期待されるが、地衣成分の生合成に関する知見は少ない。多くの地衣菌は、エステル結合から成る芳香族化合物であるデプシドや、さらにエーテル結合を有するデプシドンを産生し、これらはポリケタイド合成酵素（PKS）によって合成されると考えられている。本研究では、アカサルオガセ（*Usnea rubrotincta*）の培養地衣菌を用い、*PKS* 遺伝子に注目して、解析した。

【方法】

材料には、天然地衣体の主要成分であるβ-オルシノール系デプシドンのサラチン酸とノルスチクチン酸を産生し、増殖速度が速い *U. rubrotincta* の分離地衣菌株を用いた。液体培養から固体培養に移行して、経時的に回収・凍結乾燥後、アセトン抽出液を HPLC を用いて成分を分析した。抽出後の菌体からは RNA を抽出し、リアルタイム PCR で発現を調べた。RNA-Seq 解析によって選抜された *UrPKS5* の他に、既知の地衣類由来の *PKS* と相同性のある *U. rubrotincta* の *PKS* を探索した。また、それらの系統樹解析、および、近縁種のゲノム配列を用いた周辺領域の解析を行なった。

【結果・考察】

まず、RNA-seq 解析で見つかった多数の *PKS* のなかから、既知の地衣類由来の *PKS* と相同性の高い 7 遺伝子(*UrPKS6-12*)を新たに選抜した。リアルタイム PCR による発現解析によって、*UrPKS5* の mRNA 発現量と成分産生量がどちらも一過的に増加し、4 週目でピークに達することが分かった。しかし、他の *UrPKS* ではこのような誘導は見られなかった。成分産生と類似した発現誘導パターンを示したため、*UrPKS5* は地衣成分の生合成に関与することが示唆された。

次に、系統樹解析より、UrPKS5 は MeT を持つクレード内で独立し、他とは異なるドメイン構造を有することが分かった。UrPKS5 は MeT を持つタイプⅠ型 NR-PKS であり、β-オルシノール系ポリケタイドを形成すると考えられた。近縁種の *Usnea florida* のゲノム配列中には、*UrPKS5* ホモログがシトクロム P450 などとクラスター化しており、予測された生合成経路の反応へ関与していると示唆された。

lichen, polyketide, depsidone

講演番号：2C11p07
講演日時：3 月 18 日 15:40～ C 校舎 11 会場

# 希少放線菌 *Lechevalieria aerocolonigenes* K10-0216 株が生産する pyrizomicin の生合成研究

# Study of pyrizomicin biosynthesis in a rare actinomycete strain *Lechevalieria aerocolonigenes* K10-0216

○木村 徹[1]、稲橋 佑起[2]、高田 拓和[1]、岩月 正人[1,2]、塩見 和朗[1,2]、高橋 洋子[2]、大村 智[2]([1]北里大学感染制御科学府、[2]北里大学北里生命科学研究所)
○Toru KIMURA[1], Yuki INAHASHI[2], Hirokazu TAKADA[1], Masato IWATSUKI[1,2], Kazurou SHIOMI[1,2], Yoko TAKAHASHI[2], Satoshi OMURA[2] ([1]Grad. Sch. Infect. Cont. Sci., Kitasato Univ., [2]Kitasato Inst. Life Sci., Kitasato Univ.)

【目的】

我々は、これまで分析機器を用いて放線菌培養液抽出物に含まれる化合物の分子量、分子組成、紫外線吸収や極性などを指標とした “Physicochemical (PC) screening” により新規物質を探索してきた。昨年度本大会において、 *Lechevalieria aerocolonigenes* K10-0216 株の培養液から PC screening によって発見された新規物質 pyrizomicin について報告した（木村ら, 日本農芸化学会 2016 年度大会, P-4B004)。Pyrizomicin はピリジン環およびチアゾール環が連結したユニークな構造を有しており、双方が繋がった骨格を有する化合物の生合成に関する報告はない。本発表では pyrizomicin 生合成遺伝子クラスターの同定とその推定生合成経路について報告する。

【方法および結果】

*L. aerocolonigenes* K10-0216 株のドラフトゲノムシークエンスを antiSMASH で解析し、pyrizomicin の生合成遺伝子クラスターを推定した。その結果、ビピリジル環を有する collismycin の生合成遺伝子クラスターと類似した NRPS-PKS ハイブリッド酵素を含む遺伝子クラスター（約 40 kb）が prizomycin の生合成に関わると予想された。pOJ446 を用いて K10-0216 株のゲノム DNA のコスミドライブラリーを作製し、PCR により当該遺伝子クラスターを探索した結果、クラスターの中流から下流領域 (約 25 kb) を含むコスミドを取得した。得られたコスミドを BAC ベクターに乗せ換え、上流から中流領域 (約 15 kb) を 5 kb ずつの断片に分けて PCR で増幅させた後、Gibson assembly を用いて連結させることにより、pyrizomicin 生合成遺伝子クラスターの全領域を含むベクターを構築した。また、当該遺伝子クラスターに存在する LuxR family 転写制御因子を発現させるベクターを別途構築した。それらベクターを *Streptomyces lividans* TK24 に導入し、pyrizomicin の生産を試みた結果、当該遺伝子クラスターおよび転写制御因子の両方を導入した株でのみ pyrizomicin の生産が確認された。以上の結果より、pyrizomicin 生合成遺伝子クラスターの発現は LuxR family 転写制御因子によって正に制御されており、pyrizomicin は NRPS-PKS ハイブリッド酵素を含む生合成酵素から脂肪酸をスターターとし、システイン 2 分子、マロニル CoA およびロイシンを基質に合成されることが示唆された。

Actinomycetes, *Lechevalieria aerocolonigenes*, Biosynthesis

講演番号：2C11p08
講演日時：3 月 18 日 15:55～ C 校舎 11 会場

*Trichoderma* sp. USF-2690 産生 sorbicillinol の生合成研究
Biosynthetic study on sorbicillinol isolated from *Trichoderma* sp. USF-2690
○寺島 健仁、河上 悠香、並木 大輔、森岡 陽、清水 寛之、加藤 達也、菅谷 紘一、小野瀬 淳一、阿部 尚樹（東農大院・食品栄養）
○Takehito Terajima, Yuuka Kawakami, Daisuke Namiki, You Morioka, Hiroyuki Shimizu, Tatsuya Kato, Kouichi Sugaya, Junichi Onose, Naoki Abe (Graduate School of Agri., Tokyo Univ. of Agri.)

【目的】 糸状菌 *Trichoderma* sp. USF-2690 は、静岡県静岡市の土壌より分離され、これまでにその培養液から 8 種類の新規化合物を含む計 13 種類の単量体 sorbicillinoid 類、二量体 bisorbicillinoid 類が単離されている。Bisorbicillinoid 類はユニークな炭素骨格を有するのに加え、様々な興味深い生理活性を有することからその生合成経路にも関心が持たれてきたが、我々のグループは bisorbicillinoid 類生合成における鍵化合物である sorbicillinol (**1**)を単離することにより **1** を起点とした bisorbicillinol 等の bisorbicillinoid 類への生合成経路の存在を明らかにした [1)]。一方、2014 年に Cox らは、酢酸単位をスターターとしポリケチド合成酵素により作られた sorbicillin (**2**)に酸化酵素が触媒することで 6 位に酸素原子が導入され、**1** が生合成されるという経路を報告した [2)]。しかし、Cox らの経路は、我々が単離構造決定した 5-epihydroxyvertinolide (**3**)の生合成経路 [3)]を説明できないことに加え、安定同位体 $^{13}C$ を用いたトレーサー実験により不可逆的に **1** から **2** が生合成されるという我々の実験結果 (未発表)とも矛盾が生じる。そこで、Cox らの実験結果とも矛盾せず、**3** の生合成も説明可能な新たな **1** を起点とする生合成経路を推定し、この推定生合成経路の存在を明らかにするため **1** の生合成の鍵と予想される 6 位酸化酵素 (oxygenase)を遺伝子破壊のターゲットとすることで、oxygenase 破壊株に蓄積されると予想される生合成中間体の探索を行うこととした。
【方法および結果】 USF-2690 株から得られた生合成遺伝子クラスターは、Cox らが報告した *Penicillium chrysogenum* E01-10/3 の生合成遺伝子クラスター[2)]と非常に相同性の高いものであったことから、6 位酸化酵素と予想される FAD-dependent monoxygenase (*g5300*)遺伝子を破壊するため、hygromycin B 耐性遺伝子をターゲット遺伝子に組み込んだ pAUR316-Oxy-Hyg プラスミドを In-Fusion Cloning により作製、これを用いてプロトプラスト-PEG 法による形質転換を行った。形質転換体 (*Δ*Oxy 株)作製における正否は PCR により確認した。Wild type (wt)及び *Δ*Oxy 株の液体培養より得られた培養上清を HPLC 分析に供した結果、*Δ*Oxy 株から **1** の消失に加え wt には存在しない新たなピークの発現が確認された。このピークから得られた UV スペクトルの形状は、Cox らの経路から予想される生成物 **2** の UV スペクトルとは明らかに異なるものであった [2)]。現在、高分解能 LC/MS 分析、生合成中間体の精製、及び *in vitro* での酵素変換試験の検討を行っている。
1) N. Abe et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 12606-12607; 2) A. al Fahad et al., *Chem. Sci.*, 2014, **5**, 523-527 ; 3) K. Sugaya et al., *Tetrahedron Let.*, 2008, **49**, 654-657

biosynthesis, sorbicillinol, *Trichoderma* sp. USF-2690

発表責任者：阿部 尚樹（abe@nodai.ac.jp）

講演番号：2C11p09
講演日時：3 月 18 日 16:10～ C 校舎 11 会場

# Trichoderma 属糸状菌由来テルペン合成酵素の探索と機能解析

# Genome mining and functional analysis of terpene cyclases from Trichoderma

○寺本 和矢[1]、石神 健[2]、野中 健一[3]、塩見 和朗[3]、西山 真[1]、葛山 智久[1]([1]東大・生物工学セ、[2]東大院・応生化、[3]北里大・生命研)
○Kazuya TERAMOTO[1], Ken ISHIGAMI[2], Kenichi NONAKA[3], Kazurou SHIOMI[3], Makoto NISHIYAMA[1], Tomohisa KUZUYAMA[1] ([1]BRC, UTokyo, [2]UTokyo, [3]Kitasato Inst. Life Sci., Kitasato Univ.)

【目的】

現在までに多様な構造と生理活性を持つテルペノイド及びその生合成遺伝子が報告されており，医薬品あるいは工業原料として多くの重要な活性を有している。糸状菌由来のジテルペン，セスキテルペン合成酵素は数多く報告されている一方で，[1] モノテルペン合成酵素遺伝子が報告された例は 2015 年に報告された *Hypoxylon* sp.由来 1,8-Cineole 合成酵素一例のみである。[2] *Trichoderma* 属糸状菌は土壌中に広く存在する緑色胞子を形成する糸状菌であり,同属の複数の糸状菌の代謝物から複数のモノテルペンが同定されているが，その生合成遺伝子が報告された例は少ない。[3] そこで，ジテルペンである wickerol を生産することが報告されている *T. atroviride* FKI-3849 株[4] もモノテルペノイドの生産能およびその生合成遺伝子を有していると考え，テルペン合成酵素遺伝子の探索と機能解析を行った。

【方法・結果】

*T. atroviride* FKI-3849 株ドラフトゲノム配列中から，テルペン合成酵素遺伝子の探索を行った。機能解析されたテルペン合成酵素のアミノ酸配列から作製した統計モデル (隠れマルコフモデル; HMM) を使用したモチーフ配列の探索を行ったところ，7 種のテルペン環化酵素と推定される配列 (TaTC1~7) を見出した。これらの配列を糸状菌 *Aspergillus oryzae* M-2-3 に導入した異種発現株を作製し培養液抽出物を GC-MS により分析したところ，*taTC3* 導入株が複数のモノテルペン化合物を生産していることを見出した。そこで，組換え酵素を用いた *in vitro* での機能解析を行うべく，*T. atroviride* FKI-3849 株から調製した cDNA を大腸菌に導入し，N 末端に His タグを付加した可溶性タンパク質として精製した。TaTC3 を $Mg^{2+}$イオン存在下で GPP, FPP あるいは GGDP とインキュベーションし反応産物を GC-MS により分析したところ，GPP のみを基質として受け入れ単一の生産物を与えることがわかった。さらに反応産物を大量に調製して各種一次元，二次元 NMR により構造解析を行い，また，有機合成した標品と旋光度を比較することで，TaTC3 の反応産物は(−)-*cis*-piperitol であることを明らかにした。piperitol はユーカリの葉などに含まれることが報告されていたが，生合成酵素の同定はこれが初めてである。

【引用文献】

(1) Quin, M. *et al*. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, 31, 1449–1473. (2) Shaw, J. *et al*. *J. Biol. Chem.* **2015**, 290, 8511–8526. (3) Crutcher, F. K. *et al*. *Fungal Genet. Biol.* **2013**, 56, 67–77. (4) Yamamoto, T. *et al*. *Tetrahedron* **2012**, 68, 9267–9271.

Terpenoids, Terpene cyclase, Genome mining

発表責任者：葛山智久（utkuz@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2C11p10
講演日時：3 月 18 日 16:25～ C 校舎 11 会場

シクロラバンデュリル二リン酸合成酵素の結晶構造解析
Crystallographic analysis of cyclolavandulyl diphosphate synthase
○小林 正弥[1]、富田 武郎[1]、品田 哲郎[2]、西山 真[1]、葛山 智久[1] ([1]東大・生物工学セ、[2]阪市大院・理)
○Masaya KOBAYASHI[1], Takeo TOMITA[1], Tetsuro SHINADA[2], Makoto NISHIYAMA[1], Tomohisa KUZUYAMA[1] ([1]BRC, UTokyo, [2]Osaka City Univ.)

シクロラバンデュリル二リン酸合成酵素（CLDS)は、放線菌 *Streptomyces* sp. CL190 の生産するラバンドシアニンの生合成酵素の一つであり、2 分子のジメチルアリル二リン酸（DMAPP)の縮合反応とそれに続く環化反応を触媒して、環状モノテルペンであるシクロラバンデュリル二リン酸（CLPP)を合成する。CLDS のアミノ酸配列は、*cis* 型プレニル二リン酸合成酵素（*cis*-IDS)と 30%程度の相同性を示す。*cis*-IDS ファミリーに属する酵素としては、炭素数 55 の非環状のウンデカプレニル二リン酸を合成する UPPS や、2 分子の DMAPP が”head-to-middle”で縮合した非環状モノテルペンであるラバンデュリル二リン酸を合成する LiLPPS が報告されているが、CLDS のように同一の酵素が縮合と環化の両方の反応を触媒する *cis*-IDS は今日まで見出されていない。そこで CLDS の反応機構を解明するため、本酵素の X 線結晶構造解析および構造に基づく変異体解析に取り組んだ。

CLDS の結晶化スクリーニングの結果、DMAPP を添加した条件下で 1.73 Å 分解能の native データの取得に成功した。また SeMet 置換体の結晶を得ることに成功し、単波長異常分散法により CLDS の構造決定を行った。native CLDS の結晶の非対称単位には 2 分子の CLDS が含まれ、いずれの活性中心においても緩衝液由来の Tris および酵素反応により生成したと考えられる 2 分子のピロリン酸と、$Mg^{2+}$ イオンが結合していた。本酵素はホモ 2 量体を構成しており、その構造は UPPS などに見出される *cis*-IDS ファミリー特有のものであることがわかった。

活性中心の構造は LiLPPS のものと類似しており、ピロリン酸および $Mg^{2+}$ イオンの結合様式も類似していた。一方、DMAPP のジメチルアリル基の認識部位は CLDS では予想外にも Tris が結合していたが、この部位を構成するアミノ酸残基の多くは LiLPPS とは異なっていた。CLDS では、活性中心ポケットのサイズが小さく、2 つのジメチルアリル基の接近を促す形状になっており、環化反応が促進されるように設計されていると考えられる。

以上の結果から、CLDS の触媒する環化反応の制御には、2 つのジメチルアリル基の接近を許容するようなポケット内のアミノ酸残基の配置が重要な要因の一つであることが示唆された。これまでに発見されているテルペン合成酵素の中でも、*cis*-IDS ファミリーに属する酵素が環化反応を触媒する報告例はなく、本研究は新奇のテルペン環化機構の発見および解明に寄与するものと期待している。

terpenoid biosynthesis, Streptomyces, crystal structure

発表責任者：葛山智久（utkuz@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2C11p11
講演日時：3 月 18 日 16:50～ C 校舎 11 会場

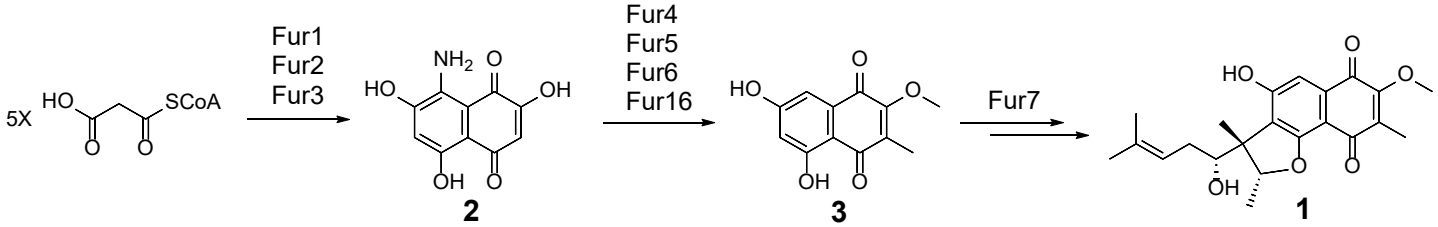
# 放線菌のメロテルペノイド生合成における普遍的脱アミノ化機構の解析

# Studies on common deamination mechanism in the biosynthesis of meroterpenoids from Streptomyces

○野口 智弘、工藤 慧、西山 真、葛山 智久（東大・生物工学セ）
○Tomohiro NOGUCHI, Kei KUDOU, Makoto NISHIYAMA, Tomohisa KUZUYAMA (BRC, UTokyo)

【背景】Furaquinocin D（**1**）は、放線菌によって生産されるメロテルペノイドの一種であり、21 個の遺伝子（*fur1–21*）によって生合成される[1]。これまでに、**1** の生合成中間体として、Fur1, 2, 3 によって malonyl-CoA から生合成される 8-amino-flaviolin（**2**）が同定されている[2]。興味深いことに、Fur1–3 ホモログは他のメロテルペノイド生合成遺伝子クラスター中にも保存されており、このことは、**2** が共通の生合成中間体であることを示唆している。さらに、いずれの最終産物のメロテルペノイドにもアミノ基が存在しないことを考え合わせると、**2** 以降に起こる脱アミノ化は放線菌の生産するメロテルペノイド生合成における共通経路であることが強く示唆される。また、この脱アミノ化はアミノ基が水素原子に置換される形で起こっており、アミノ基がカルボニル基に置換される通常の酸化的脱アミノ化とは異なる新奇の反応機構によるものであることが推測される。**1** の生合成においては、ゲラニル基転移酵素（Fur7）の基質である生合成中間体、2-methoxy-3-methylflaviolin（**3**）も同定されている[3]。**3** には既にアミノ基は存在しないことから、**2** から **3** への変換過程で未知の脱アミノ化が起こると考えられる。本研究では、この新奇脱アミノ化反応機構の解明を目的とした。

【方法・結果】**2** から **3** への変換が ATP と SAM の存在下で Fur4, 5, 6, 16 の 4 つの酵素依存的に起こることを見出した。Fur4 と Fur6 はいずれも methyltransferase、Fur5 は CoA ligase、Fur16 は N-monooxygenase と相同性を示す。このうち Fur5 と Fur16 が脱アミノ化反応に関与すると推定し、これらの酵素の *in vitro* 反応を行ったところ、未知の反応産物を検出した。現在、この反応生成物の構造解析を行っている。




[1] T. Kawasaki, *et al. J. Bacteriol.* 188: 1236 (2006)
[2] S. Isogai, *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22: 5823 (2012)
[3] T. Kumano, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 285: 39663 (2010)

polyketide, terpenoid, deaminase

発表責任者：葛山智久（utkuz@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2C11p12
講演日時：3 月 18 日 17:05～ C 校舎 11 会場

# ペプチジルヌクレオシド系抗生物質 Amipurimycin の生合成に関する研究
# Studies on the Biosynthesis of the Peptidyl Nucleoside Antibiotic Amipurimycin

○池内 秀雄[1]、白石 太郎[1]、新家 一男[2]、西山 真[1]、葛山 智久[1] ([1]東大・生物工学セ、[2]産総研)
○Hideo IKEUCHI[1], Taro SHIRAISHI[1], Kazuo SHIN-YA[2], Makoto NISHIYAMA[1], Tomohisa KUZUYAMA[1] ([1]BRC, UTokyo, [2]AIST)

【目的】

Amipurimycin (APM) はニューギニナ土壌サンプルから単離された *Streptomyces* sp. T-36496 株の培養液中から発見されたペプチジルヌクレオシド系抗生物質である[1,2]。APM はイモチ病の病原菌である *Pyricularia oryzae* の生育を特異的に阻害するため[1]、新規農薬として開発できる可能性がある。APM は 2-aminopurine、cispentacin、1,2-dihydroxyethyl 基を側鎖に持つ糖など特徴的な構造を有しているが、生合成に関する報告はなかった。そこで本研究では APM の生合成経路の全容を解明することで新たな創薬や新規酵素の発見を目的とした。

【方法と結果】

APM はペプチド結合を有することから、NRPS 又は ATP-grasp domain をコードする遺伝子が APM 生産に関与すると推測した。APM 生産菌のゲノム情報からこれらをコードする遺伝子及び周辺領域を *in silico* で解析した結果、4 つの遺伝子が候補として見出された。それぞれの遺伝子破壊株を作製しそれらの培養液を LC-MS で解析した結果、*orf40* あるいは *orf47* 破壊株では APM 生産能が失われ、生合成中間体と推測される化合物を蓄積することを見出した。そこで、*orf40* と *orf47* の周辺 114.3kb の領域を含む BAC クローンを作製し、異種放線菌 *Streptomyces albus* G153 株に導入した。この培養液を LC-MS で解析した結果 APM が検出されたことから、この領域に生合成遺伝子クラスターが含まれることが明らかとなった。また SARP とアノテーションされる *orf49* の強発現株培養液を LC-MS で分析した結果、野生株培養液と比べて約 18 倍の APM が検出された。次に、APM と同様な糖構造を有する miharamycin の生産菌である *Streptomyces miharaensis* SF-489 株のドラフトシークエンスを取得した。*in silico* 解析の結果、*orf47* のホモログである *MJ1-01476* を含む miharamycin 推定生合成遺伝子クラスターを得た。そこで、この *MJ1-01476* を *orf47* 破壊株に導入し培養液を LC-MS で解析した結果、cispentcin 部分が arginine に置き換わった新規化合物が検出された。

【文献】

1) Iwasa, T., *et al*., *J Antibiot*, **30**, 1-10 (1977)
2) Harada, S. and T. Kishi, *J Antibiot*, **30**, 11-6 (1977)

Streptomyces, biosynthesis, natural product

発表責任者：葛山智久（utkuz@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2C11p13
講演日時：3 月 18 日 17:20～ C 校舎 11 会場

# カプラザマイシン生合成における小タンパク質を介したアシル化反応の発見

# Discovery of the protein-mediated acylation in caprazamycin biosynthesis

○白石 太郎[1]、廣 昇[1]、五十嵐 雅之[2]、西山 真[1]、葛山 智久[1] ([1]東大・生物工学セ、[2]微化研)
○Taro SHIRAISHI[1], Noboru HIRO[1], Masayuki IGARASHI[2], Makoto NISHIYAMA[1], Tomohisa KUZUYAMA[1] ([1]BRC, UTokyo, [2]BIKAKEN)

【目的】カプラザマイシン類は 2003 年に放線菌 *Streptomyces* sp. MK730-62F2 より単離されたヌクレオシド系抗生物質である[1]。その誘導体である CPZEN-45 は優れた選択的抗結核菌活性を有すること[2]、さらにその作用機序がユニークであることから[3]、新たな抗結核菌薬として期待されている。しかしながらその生合成遺伝子クラスターは同定されているものの[4]、生物活性に必須であるアシル側鎖形成機構をはじめとして、生合成経路の全容は未解明のままであった。そこで、本研究ではカプラザマイシンの生合成経路を明らかにすることで、新規酵素の発見やカプラザマイシンの効率的な生産につながる知見を得ることを目的とした。
【方法】カプラザマイシンの生合成遺伝子クラスター中の各遺伝子の破壊株を作製し、その培養抽出液を解析することで生合成中間体と推測される化合物の同定を試みた。次に同定した生合成中間体候補化合物と、破壊した遺伝子産物の組換え酵素を用いて *in vitro* 活性試験を行うことで各種酵素の機能同定と生合成経路の同定を試みた。
【結果・考察】各遺伝子破壊株の培養抽出液を解析した結果、*cpz23* と *cpz24*、そして両遺伝子間に新たに見出した 204 bp の orf（*cpzX*）の破壊株においてカプラザマイシンにアシル側鎖が付加しておらず、アミノ糖にリン酸基が付加した caprazol-3”-phosphate (**1**)が蓄積することが明らかになった[5]。次に **1** と Palmitoyl-CoA を Cpz23、Cpz24、CpzX の組換え酵素と共に反応に供し反応産物を解析した。その結果、三つの酵素が揃った場合にのみ Palmitoyl 基が付加した **1** と推測される化合物が検出された。さらに詳細な解析に基づき、この反応機構を次のように提唱する。まず Cpz24 の基質となる **1** が、CpzX の C 末端側のロイシン-セリン間のペプチド結合を求核攻撃し、CpzX の C 末端 11 アミノ酸の脱離を伴い CpzX-**1** 複合体が形成される。次に、この複合体を基質に Cpz23 によるアシル化反応が進行し、最後に再び Cpz24 の作用でもう一分子の **1** がこの複合体に求核攻撃を行いアシル化体の放出と CpzX-**1** 複合体の再形成がおこるというものである。CpzX は、**1** のような親水性に富んだ中間体を、疎水性の高い中間体へと変換する反応を媒介する一種のキャリアタンパク質として作用していることが推測される。
【文献】1) Igarashi, M. et al., *J. Antibiot.* 2003, 56, 580. 2) Takahashi, Y. et al., *J. Antibiot.* 2013, 66, 171. 3) Ishizaki, Y. et al., *J. Biol. Chem.* 2013, 288, 30309. 4) Kaysser, L. et al., *J. Biol. Chem.* 2009, 284, 14987. 5) Shiraishi, T. et al., *J. Gen. Appl. Microbiol.* 2016, 62(3), 164

nucleoside antibiotics, natural product, Streptomyces

発表責任者：葛山智久（utkuz@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2C11p14
講演日時：3 月 18 日 17:35～ C 校舎 11 会場

*Streptomyces* sp. SpE090715-01 produces a maleimycin-like compound using amino-group carrier protein (AmCP)

○Muhammad Prima PUTRA[1], Naito KAZUHIRO[1], Matsuda KENICHI[1], Tomita TAKEO[1], Shin-ya KAZUO[2], Kuzuyama TOMOHISA[1], Nishiyama MAKOTO[1] ([1]BRC, UTokyo, [2]The National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST))

Recently, our laboratory discovered a novel secondary metabolite biosynthetic machinery in *Streptomyces* sp. SANK 60404 (Hasebe et al., 2016). In this novel secondary metabolite biosynthetic machinery, an amino-group carrier protein (AmCP) is responsible for recognition of an amino acid as a substrate and further brings it into the secondary metabolic pathway. Until the finding of AmCP, only carrier proteins attached to the carboxyl group of the substrate, including acyl carrier protein for fatty acid and polyketide synthase and peptidyl carrier protein for non-ribosomal peptide syntethase are known. Therefore this discovery also became the first finding of a carrier protein that recognized the amino groups of biosynthetic intermediates. In *Streptomyces* sp. SANK 60404, AmCP gene cluster was found to produce the novel non-proteinogenic amino acid named DADH ((2S,6R)-diamino-(5R,7)-dihydroxy-heptanoic acid). DADH was further recognized by NRPS gene encoded in the flanking region and used as an intermediate to synthesize a unique azabicyclic ring compound named Vazabitide. During the study on AmCP containing-streptomyces in our culture collection, it was revealed that each strain possesses various genes in flanking regions of AmCP-coding genes, which means that each strain might produce various novel compounds. Comparison of the amino acid sequence of various AmCPs enables us to classify AmCPs into two groups. One group (type I) has the amino acid sequence EDWGE at the C terminus, while other group (type II) does RDWGQ. In type I AmCPs, glutamate residue at the C terminus is necessary to be fused with the substrate in biosynthesis. In type II AmCPs, the C-terminal residue is replaced by glutamine. Based on this observation, we expect that type II AmCPs needs deamination to be attached to a substrate.

In the present study, we studied the type II AmCP gene cluster from *Streptomyces* sp. SpE090715-01. The gene cluster composed of 17 genes which are different from those of the vazabetide biosynthetic gene cluster of SANK 60404. To detect the compound directed by the gene cluster of the strain, we deleted the gene that is annotated to be hydrolase located 7.4 kb upstream the AmCP gene. The comparison of the metabolites profile between the wild type and the knockout mutant revealed that a compound with *m/z* 172.0589 [$(M+H)^+$] was abolished in the mutant. Structure determination by NMR showed that this compound had the similar structure to that of maleimycin, a bicyclic maleimide antibiotic discovered in 1973 (Elstner, et al. 1973). Until now, no report has been published on the biosynthetic pathway of maleimycin. This study contributes to the discovery of a novel biosynthetic pathway mediated by AmCPs machinery.

amino-group carrier protein, maleimycin, streptomyces

発表責任者：Makoto Nishiyama（umanis@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2C11p15
講演日時：3 月 18 日 17:50～ C 校舎 11 会場

新規天然化合物 s56-p1 の特異なヒドラゾンユニットの生合成に関する研究
Insight into the biosynthesis of the hydrazone unit in s56-p1
○松田 研一[1]、新家 一男[2]、葛山 智久[1]、西山 真[1] ([1]東大・生物工学セ、[2]産総研)
○Kenichi Matsuda[1], Kazuo Shin-ya[2], Tomohisa Kuzuyama[1], Makoto Nishiyama[1] ([1]BRC, UTokyo, [2]AIST)

窒素－窒素(N-N)結合を有する天然化合物はこれまで 200 種類以上単離されており、多様な構造と生物活性を示すことが知られている。N-N 結合はこれら化合物の活性に重要な役割を果たすが、その生合成機構は不明である。これまでに N-N 結合を含む化合物の生合成遺伝子クラスターがいくつか報告されているが、それらすべてに共通した遺伝子は見いだされないことから、天然には複数の N-N 結合形成機構が存在すると考えられる。一方、当研究室で発見された新規キャリアタンパク質 AmCP の遺伝子を指標とした探索により、特異なヒドラゾンユニットを有する天然化合物 s56-p1 が発見された。これまでにヒドラゾンは天然から複数単離されているが、s56-p1 は生合成遺伝子クラスターが初めて明らかにされたヒドラゾンである。そこで本研究では s56-p1 のヒドラゾンユニットの生合成機構を明らかにし、天然化合物における N-N 結合形成機構に関する知見を得ることを目指した。

前回大会にて、s56-p1 生合成遺伝子クラスター中の *orf37-orf44* がヒドラゾンユニット生合成に関与することを報告した。今回はまず、本領域の異種発現とヒドラジン検出(DAB)アッセイにより、N-N 結合形成に関与する遺伝子の探索を行った。各遺伝子破壊株の DAB アッセイの結果、*orf38, orf40* が N-N 結合形成に必須であることが明らかとなった。ORF38, ORF40 はそれぞれ lysine $N^6$ monooxygenase, methionyl-tRNA synthetase と相同性を有している。ORF38 の組み換え酵素を調製し、*in vitro* アッセイを行ったところ、ORF38 は実際にリジン $N^6$ 位の水酸化活性を有することが確かめられた。

次に ORF40 の機能に関する知見を得るため、*orf40* を *orf38* とともに大腸菌に導入し、代謝物を LC-MS にて分析した。その結果、これら 2 つの遺伝子を発現した大腸菌は未知化合物 1 を生産することが明らかとなった。本化合物を $^{15}N$ ラベルし、また 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB)で修飾したのち単離精製し構造決定を行ったところ、化合物 1 はリジンのε-アミノ基とグリシンのアミノ基が N-N 結合でつながった特異なヒドラジンであることが明らかとなった。またグリシン酸化酵素と相同性を示す ORF39 の組み換え酵素を調製し、FAD 共存下で化合物 1 と反応したところ、化合物 1 がヒドラジノ酢酸へと変換された。さらに *orf38, orf39, orf40* の大腸菌における異種発現によりヒドラジノ酢酸の生産を確認した。以上により、s56-p1 のヒドラゾンユニットの前駆体となると考えられるヒドラジノ酢酸生合成経路が明らかとなった。今後 ORF40 の詳細な解析を通じて二次代謝における N-N 結合形成のメカニズムが明らかになることが期待される。

biosynthesis, natural product, N-N bond

発表責任者：西山真（umanis@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2C11p16
講演日時：3 月 18 日 18:05～ C 校舎 11 会場

Isolation of isoindolinomycin, a novel isoindolinone-derived natural product discovered via activation of cryptic gene cluster from Streptomyces.

○Wei li THONG[1], Kazuo SHIN-YA[2], Makoto NISHIYAMA[1], Tomohisa KUZUYAMA[1] ([1]BRC, UTokyo, [2]AIST)

It is now well established from genome sequencing that an actinomycete strain has more than 20 biosynthetic gene clusters predicted to encode different structural classes of secondary metabolites. Of these metabolites, many have profound clinical impact due to their antitumor and antibacterial activities. However, only a small fraction of the biosynthetic gene clusters is expressed under standard cultivation condition and in many cases, they encode for known compounds. The remaining gene clusters are classified as cryptic or orphan, because the metabolites produced by these clusters are unidentified. Previously, we reported two new methylbenzene-containing compounds discovered via a cryptic gene activation strategy by screening of rifampicin-resistant mutants.[1-2] Here, we present a compound with a new skeleton structure identified through the same method. Induction of rifampicin resistance in 9 actinomycete strains generated 114 rifampicin-resistant mutants (*rif* mutants). Comparative metabolic screening on some these *rif* mutants with their wild type strains indicated that a mutant (S55-50-5) overproduced 2 unidentified metabolites (**1** and **2**), which are almost undetectable in its wild type *Streptomyces* sp. SoC090715LN-16. Isolation and structural elucidation were performed, but only the structure of compound **2** was successfully elucidated due to the low quantity of compound **1**. Compound **2** was found to be a novel compound with a new isoindolinone-derived tetracyclic skeleton attached with a chloro and a sugar moiety. Comparison between the mass fragmentations of **1** and **2** indicated that compound **1** is most probably an aglycone of compound **2**. Also, compound **2** was found to show potent cytotoxicity against different cell lines tested and antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*. Hence, compound **2** was named as isoindolinomycin. BLAST searches against the draft genome sequence of SoC090715LN-16 using a halogenase homolog as query, revealed a biosynthetic gene cluster that could be responsible for the production of isoindolinomycin. Gene disruption experiments confirmed the assumption and further investigations on the biosynthetic mechanism of these novel compounds are still in progress.

1. Hosaka T. et al. *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 462.
2. Thong W.L. et al. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 857.

Cryptic gene, Natural products, Biosynthesis

発表責任者：葛山智久（utkuz@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2C12a01
講演日時：3 月 18 日 09:20～ C 校舎 12 会場

# ピラノフラボノイド類の合成及び構造活性相関に関する研究

# Synthesis of pyranoflavonoid and their structure activity relationship

○埋橋 昇大[1]、川井 悟[1]、常盤野 哲生[2]、吉澤 結子[2] ([1]東電大理工、[2]秋田県大生資科)
○Shota UZUHASHI[1], Satoru KAWAII[1], Tetsuo TOKIWANO[2], Yuko YOSHIZAWA[2] ([1]Tokyo Denki Univ., [2]Akita Preferctural Univ.)

【目的】フラボノイド類には，フラン環あるいはピラン環が縮合した化合物も数多く知られており，それぞれフロフラボノイドやピラノフラボノイドとよばれている。ピラノフラボノイドには単純フラボノイド骨格よりも拡張したπ電子系が存在し，このようなπ電子系が生物活性にどのような影響を及ぼすか興味が持たれている。近年、一部のピラノフラボノイド類について生理作用や作用機序に関する研究は行われているが、天然資源中にはピラノフラボノイド類は微量にしか存在しないため、構造と活性に関する体系的研究は十分とは言い難い。

当研究室ではこれまでに、おもに 7-8 位にピラン環が縮合したピラノフラボノイド類を系統的に合成し、その構造活性相関に関する研究を行い、ピラン環縮合が活性発現に重要な役割を果たしていることを報告している。今回は、新たにフラボノイド 5-6 位あるいは 6-7 位にピラン環が縮合したピラノフラボノイド類や、複数のピラン環を持つピラノフラボノイド類を合成し、その前骨髄性白血病細胞 HL-60 に対する増殖抑制活性を調べることで、ピラン環の縮合位置や数による生物活性への影響を検討することを目的とした。

【方法】A 環にピラン環が縮合したフラボノイド類を合成するための出発物質であるピラノヒドロキシアセトフェノン類はヒドロキシアセトフェノン類と 3-メチル-2-ブテナールをピリジン溶媒中で還流することにより、Michael 付加とこれに続く環化･脱水反応を引き起こすことで合成した。次いでピラノアセトフェノン類と安息香酸類とをジクロロメタン中、脱水縮合剤 DCC 存在下、DMAP を触媒として室温で一晩撹拌し、ベンゾアートを得た。次いで、水酸化カリウム存在下、ピリジン中 reflux で 10 分撹拌し、Baker-Venkataraman 転位を引き起こすことで β-ジケトン体を得た。これに酢酸を溶解し、100 °C まで加熱撹拌した後に 20%硫酸/酢酸溶液を加え、10 分撹拌し、環化・脱水することによりピラノフラボン骨格を構築した。また、ピラノヒドロキシアセトフェノン類とベンズアルデヒド類とをテトラヒドロフラン溶媒中ナトリウムアミドを用いて室温 2 時間または、5%水酸化カリウムエタノール溶液を用いて氷浴撹拌によりピラノカルコン類を合成した。これを PEG-400 中でヨウ素ともに、加熱撹拌し環化することでもピラノフラボン類を合成した。

【結果】本研究では、ピラン環の縮合位置、数を変えたフラボノイド類骨格 B 環に、種々の官能基を導入した化合物を中心に合成した。ピラン環導入において異性体である 6-7 位は収率が低いため、条件の検討が必要である。合成した化合物の生物活性については現在検討中である。

Pyranoflavonoid, Structure activity relationship, HL-60

講演番号：2C12a02
講演日時：3 月 18 日 09:35～ C 校舎 12 会場

ジフェニルアルカンの合成及び構造活性相関に関する研究
Synthesis of diphenylalkanes and their structure activity relationship
○梅田 駿[1]、川井 悟[1]、常盤野 哲生[2]、吉澤 結子[2] ([1]東電大理工、[2]秋田県大生資科)
○Shun UMEDA[1], Satoru KAWAII[1], Tetsuo TOKIWANO[2], Yuko YOSHIZAWA[2] ([1]Tokyo Denki Univ., [2]Akita Prefectural Univ.)

【目的】天然資源中にはフラボノイドのように、二つのベンゼン環が炭素鎖で連結されたジフェニルアルカン骨格を持つものが多く存在し、様々な生理活性を示すことが知られている。当研究室ではこれらの生理活性物質に着目し、ベンゾフェノン、スチルベン、カルコンなど、炭化水素基の両端に孤立ベンゼン環が結合した化合物を系統的に合成し、これらの構造活性相関に関する研究を行っている。しかし、これまで合成した化合物のベンゼン環連結部分に着目すると、ベンゾフェノンにはケトン、スチルベンには二重結合、カルコンには α, β-不飽和ケトンと、それぞれ異なる官能基をもつ構造であった。このため生物活性がベンゼン環連結部分の炭素鎖長に依存するのか、それとも官能基に依存するのかが明確ではなかった。そこで、これらの炭化水素基上の官能基を除去したり、あるいは他の官能基へ変換することにより、他の官能基は共通だがベンゼン環連結部分の炭素鎖長が異なる一連のジフェニルアルカン類の合成を検討することとした。さらに、合成した化合物の前骨髄性白血病細胞 HL-60 に対する増殖抑制活性を調べることで、活性発現に重要な部位に関する知見を深めることを目的とした。

【方法】ジフェニルメタン類は、ポリリン酸中での安息香酸類とベンゼン類の Friedel-Crafts 反応によりベンゾフェノン類を調製し、これをジエチレングリコール溶媒中 KOH 触媒下ヒドラジン水和物処理による Wolff-Kishner 還元により合成した。ベンズヒドロール類は、ベンゾフェノン類の $NaBH_4$ 還元により合成した。スチルベン類は、ベンズアルデヒド類をヒドリド還元し、臭素化を経て $PPh_3$ 処理によりホスホニウム塩類とし、これを DMF 溶媒中 *t*-BuOK 触媒下ベンズアルデヒド類との Wittig 反応により合成した。このスチルベン類を EtOH 溶媒中 Pd-C 触媒下 $H_2$ 雰囲気下で接触還元を行うことで 1, 2-ジフェニルエタン類を合成した。一方、1, 3-ジフェニルプロパン類は、EtOH 溶媒中 *t*-BuOK 触媒下アセトフェノン類とベンズアルデヒド類の Claisen-Schmidt 反応によりカルコン類を調製し、$NaBH_4$ 還元によりアルコール体とした後、エーテル溶媒中 $LiAlH_3/AlCl_3$(1:3)存在下での還元により、その合成を試みた。

【結果】本研究では、おもにジフェニルメタン、1,2-ジフェニルエタン、ベンゾフェノンおよびスチルベンのメトキシル体の合成を行った。カルコン類の還元による 1,3-ジフェニルプロパン合成では、多数の副生成物が生じ目的物質の単離が困難であったため、引き続き反応条件の検討を行っている。また、生物活性については、現在検討中である。

diphenylalkane, structure activity relationship, HL-60

講演番号：2C12a03
講演日時：3 月 18 日 09:50～ C 校舎 12 会場

# ピラノクマリン類の合成及び構造活性相関に関する研究

# Synthesis of pyranocoumarins and their structure activity relationship

○松浪 悠貴[1]、川井 悟[1]、常盤野 哲生[2]、吉澤 結子[2] ([1]東電大理工、[2]秋田県大生資科)
○Yuki MATSUNAMI[1], Satoru KAWAII[1], Tetuo TOKIWANO[2], Yuko YOSHIZAWA[2] ([1]Tokyo Denki Univ., [2]Akita Prefectual Univ.)

【目的】生理活性発現部位は分子中に一つだけであることを前提に創薬が進められた結果、新規構造の枯渇が問題となっている。そこで生理活性発現部位を複数組み合わせた複合分子による新たな生物活性の発現や活性増強に注目が集まっている。本研究では、クマリン A 環にピラン環が縮合したピラノクマリンとスチルベンの複合分子である 3-フェニルピラノクマリンについて検討することとした。

クマリン類は *2H*-1-benzopyran-2-one の縮合二環性骨格を基本とする化合物群である。セリ科、ミカン科、マメ科などの天然資源中に多様な構造が見出されている他に、高機能性分子合成のための足場化合物として多様なクマリン類が作り出されている。本発表で扱うピラノクマリン自体にも興味深い生物活性が知られている。例えば、イソマツ科ルリマツリ属植物 *Plumbago zeylanica* 由来の seselin やマメ科デリス属植物 *Derris laxifolia* 由来の(+)-decursinol が示すマウス抗侵害受容作用などが報告されている。一方、スチルベンは、1,2-ジフェニルエテン構造をもち、二重結合の立体化学により *E* 体と *Z* 体が存在する。その生物活性は興味深く、シクンシ科シクンシ属植物 *Combretum leprosum* 由来の combretastatin A-4 は、チューブリン二量体に結合して微小管重合を阻害し、内皮細胞の有糸分裂を停止してアポトーシスへ誘導することから、その臨床応用が期待されている。

本発表ではピラノクマリンースチルベン化合物の構造活性相関に関する知見を深めることを目的として、3-フェニルピラノクマリン骨格に種々の官能基を導入した化合物を系統的に合成し、その生物活性を検討した。

【方法】本研究では、出発物質である 2`,6`-ジヒドロキシアセトフェノンをピリジン触媒下で 3-メチル-2-ブテナールと Michael 付加反応を引き起こすことで、ピラノヒドロキシアセトフェノンを合成した。これをジクロロメタン溶媒中、DCC、DMAP 存在下でフェニル酢酸類と反応させ、エステル中間体を合成した。さらに、これをジクロロメタン溶媒中 DBU 触媒下で環化して 3-フェニルピラノクマリン類を合成した。合成した化合物は、前骨髄性白血病細胞 HL-60 に対する増殖抑制を指標としてその生物活性を評価した。

【結果】3-フェニルピラノクマリンの孤立ベンゼン環に様々な官能基を導入した化合物の合成を検討しており、現在までに数十種類の化合物を合成した。各化合物の HL-60 増殖抑制活性は現在検討中である。

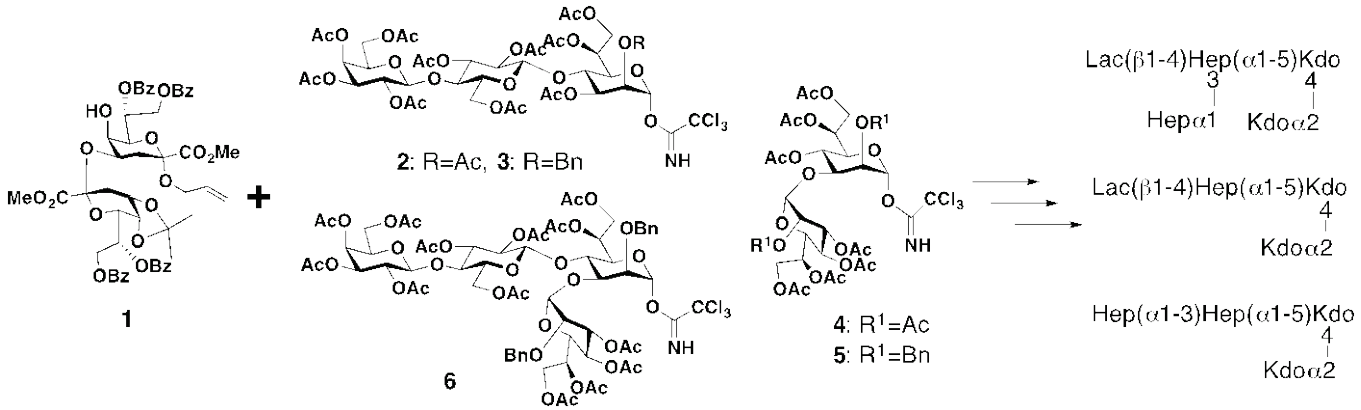
pyranocoumarin, structure activity relationship, HL60

講演番号：2C12a04
講演日時：3 月 18 日 10:05～ C 校舎 12 会場

連続分岐した LPS/LOS の内部コア糖鎖の合成研究
Synthetic study of a two branched inner-core oligosaccharide of LPS/LOS
○成本 裕文[1]、野添 未来[2]、一柳 剛[2] ([1]鳥取大院農、[2]鳥取大農)
○Hirofumi NARIMOTO[1], Miku NOZOE[2], Tsuyoshi ICHIYANAGI[2] ([1]Tottori Univ. Grad., [2]Tottori Univ.)

リポオリゴ糖(LOS)はグラム陰性細菌が細胞外膜に産生する複合糖脂質である。LOS のオリゴ糖鎖内には構造変異が少ないコア糖鎖領域が存在し，その構造は属によって異なる。近年コア糖鎖が免疫原性を示すことが明らかになり，そのエピトープの解明および抗原としての利用の観点から構造が単一な糖鎖が必要になっている。我々はコア糖鎖の構成糖である 3-デオキシ-D-マンノオクツロン酸(Kdo)、およびL-グリセロ-D-マンノヘプトース(Hep)を中心とした糖鎖の合成法に取り組んでおり，これまでに 2-4 結合を有する Kdo2 糖誘導体の 5 位水酸基へ単糖供与体を導入する経路でいくつかのオリゴ糖合成を達成してきた [1,2]。本研究ではこの経路での合成の限界を探るため分岐構造を有する Hep 糖供与体を用い、ブロック縮合による連続分岐したコア糖鎖合成を試みた。

2-4 結合を有する Kdo 2 糖受容体 **1** の 5 位水酸基に還元末端にヘプトースを有する 3 種類の直鎖オリゴ糖供与体 **2-5**，3,4 分岐構造を有する 4 糖供与体 **6** を用いて縮合反応を試み，ブロック合成の限界を調査した。その結果、反応性が低く縮合が困難とされていた Disarmed 型の Hep 2 糖供与体においてもブロック縮合が可能であることがわかった。一方，4 位に Lactose を導入した Hep 供与体を用いたグリコシル化では，armed 型の供与体を使用する必要があった。これらの結果を踏まえ，4 位に Lactose，3 位に Heptose を導入した armed 型の 3,4 分岐 Heptose 供与体を新たに調製し，これを用いてグリコシル化反応を検討した。これらの結果について報告する。




[1]Yi, R.; Ogaki, A.; Fukunaga, M.; Nakajima, H.; Ichiyanagi, T., *Tetrahedron*, **2014**, 70,3675-3682.
[2]Yi, R.; Narimoto H.; Nozoe M.; Ichiyanagi, T., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **2015**, 79, 1931-1945.

Lipopolysaccharide, Lipooligosaccharide

発表責任者：一柳剛（yanagi@muses.tottori-u.ac.jp）

講演番号：2C12a05
講演日時：3 月 18 日 10:20～ C 校舎 12 会場

LPS のコア糖鎖合成に向けた新規 Kdo 誘導体の合成
Synthesis of new Kdo derivatives for core oligosaccharides of LPS
○一柳 剛、野口 晴佳、田中 琢也、田中 奈央、谷川 優作 (鳥取大農)
○Tsuyoshi Ichiyanagi, Haruka Noguchi, Takuya Tanaka, Nao Tanaka, Yuusaku Tangawa (Torrori Univ.)

【目的】

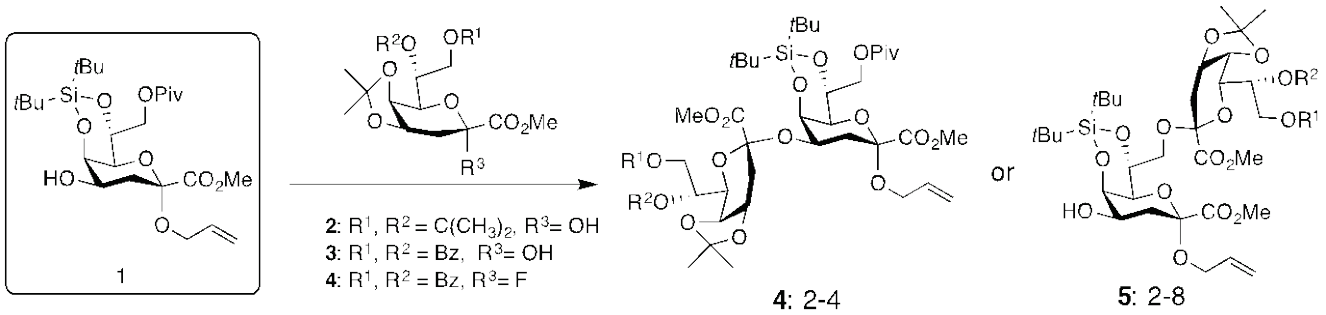
3-deoxy-D-*manno*-oct-2-ulosonic acid (Kdo)はグラム陰性菌が産生する複合糖脂質 LPS の構成糖であり，属によって構造変異が少ないコア糖鎖に 1～４分子存在する。このうち 2-4 結合を有する Kdo２糖構造は多くの LPS に保存されている。我々はこれまでにコア糖鎖の合成法に関する研究を行っており，糖鎖合成に適した Kdo 誘導体の開発[1]とこれを用いた数種のコア糖鎖合成を達成してきた[2,3]。本研究ではより糖鎖合成に適した Kdo 誘導体として，methyl (allyl 5,7-*O*-di-*tert*-butylsilylen-8-*O*-pivaloyl-3-deoxy-D-*manno*-oct-2-ulopyranoside)onate **1** を設計，合成したので報告する。

【方法と結果】

化合物 **1** は２つの経路，１つは 4,5:7,8 位をイソプロピリデン基で保護した化合物 **2**，もう一つは化合物 **3** で合成した。すなわち，化合物 **2** および **3** のアノマー位をアリル化後 4,5,7,8 位の保護基を除去し，8 位を選択的にピバロイル化，続いて 5,7 位に DTBS 基を導入することで合成が完了した。

また Kdo 誘導体 **1** の糖鎖合成への利用について検討した。Kdo 供与体を用いて **1** の 4 位水酸基へグリコシル化を行ったところ，2-4 結合を有する Kdo２糖誘導体 **4** を良好な収率で得ることが出来た。一方４位を Bn 基で保護したのち，加メタノール分解することにより，8-OH 体へと誘導し Kdo 供与体と縮合することにより 2-8 結合を有する Kdo２糖誘導体 **5** を合成することができた。

現在得られた Kdo(2-4)Kdo の DTBS 基の除去，およびヘプトース誘導体との縮合を検討しており，結果と併せて報告する。




[1] Ichiyanagi, T. *et. al. Tetrahedron*, **2011**, *67*, 5964-5971, [2] Yi, R. *et. al. Tetrahedron*, **2014**, *70*, 3675-3682, [3] Yi, R. *et. al. Biosci. Biotechnol. Biochem.,* **2015**, *79*, 1931-1945.

3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid, Lipooligosachharide, Lipopolysaccharide

発表責任者：一柳　剛（yanagi@muses.tottori-u.ac.jp）

講演番号：2C12a06
講演日時：3 月 18 日 10:45～ C 校舎 12 会場

脂質ラフトの一分子イメージングのための蛍光 GPI アンカープローブの合成
Synthetic study on fluorescently labeled GPI-anchor probe for single molecule imaging of lipid raft

○小西 美紅[1,3]、鈴木 達哉[1,3]、Pal Rita[1,3]、安藤 弘宗[1,2,3]、今村 彰宏[1]、石田 秀治[1,2]、木曽 真[1,3] ([1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大・G-CHAIN、[3]京都大・iCeMS)
○Miku KONISHI[1,3], Tatsuya SUZUKI[1,3], Rita PAL[1,3], Hiromune ANDO[1,2,3], Akihiro IMAMURA[1], Hideharu ISHIDA[1,2], Makoto KISO[1,3] ([1]Gifu Univ., [2]G-CHAIN, [3]iCeMS)

【目的】機能性細胞膜ドメインである脂質ラフトは、シグナル伝達、細菌やウイルスの感染等に密接に関わっている。我々はラフト分子の離合集散を一分子観察法により直接観察することで、脂質ラフトの形成機構及び脂質ラフトを介したシグナル伝達の仕組みの解明を目指している。GPI アンカー型受容体の一種である CD59 は、細胞外のシグナル分子との結合によってクラスターを形成し、そこにガングリオシドやコレステロールが集積することで、ラフトを構築する。また CD59 クラスターは、拡散運動と STALL と呼ばれる一時停留を繰り返し、STALL 時に細胞内へのシグナル伝達が行われることが知られている[1]。その際に共役して働くガングリオシドの挙動を解明するため、これまでに我々は、糖鎖末端に蛍光分子を導入したガングリオシドプローブの開発に取り組んできた[2]。本研究では､ガングリオシドと共局在する GPI アンカーに着目し､GPI アンカープローブの合成を目指した。
【結果】GPI アンカーは、ホスファチジルイノシトールにグルコサミン残基とマンノース 3 残基が結合した直鎖構造から成る。まず、1 位水酸基をアリル基、3 位、4 位水酸基をブタンジアセタール基で保護したマンノースを共通ユニットとし、立体選択的なグリコシル化反応によりα結合を介したトリマンノシド骨格を構築した。続いて、Bruzik らの手法[3]に従いスピロケタール形成による光学分割を経て、*myo*-イノシトール受容体を合成した。得られたイノシトール受容体と 2 位にアジド基を有するグルコサミン供与体を縮合反応に供した後、イノシトール 1 位水酸基が遊離のグルコサミニルイノシトール誘導体へと変換した。次に、ホスホロアミダイト法を用いて、イノシトールへグリセロリン脂質を導入し、グルコサミン 4 位を遊離の水酸基にすることで、グルコサミニルホスファチジルイノシトール受容体を合成した。この受容体に対し、トリマンノシド供与体を作用させることで、GPI アンカー骨格の構築に成功した。続いて、還元末端側マンノース 2 位水酸基にエタノールアミンリン酸をホスホロアミダイト法により導入した。さらに最終段階での蛍光分子導入に向け、非還元末端マンノース 6 位水酸基へのリン酸エステル結合を介したリンカーの導入検討、また GPI アンカー保護体の脱保護条件の検討を行った。本発表では、これらの詳細について報告する。

[1] K. G. N. Suzuki, *et. al. J. Cell Biol.* **2007**, *177*, 717−730.
[2] N. Komura, *et. al. Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12*, 402−410.
[3] K. S. Bruzik, *et. al. Carbohydr. Res.* **1989**, *195*, 67−73.

lipid raft, GPI-anchor, phosphoramidite

発表責任者：小西美紅（konishi@gifu-u.ac.jp）

講演番号：2C12a07
講演日時：3 月 18 日 11:00～ C 校舎 12 会場

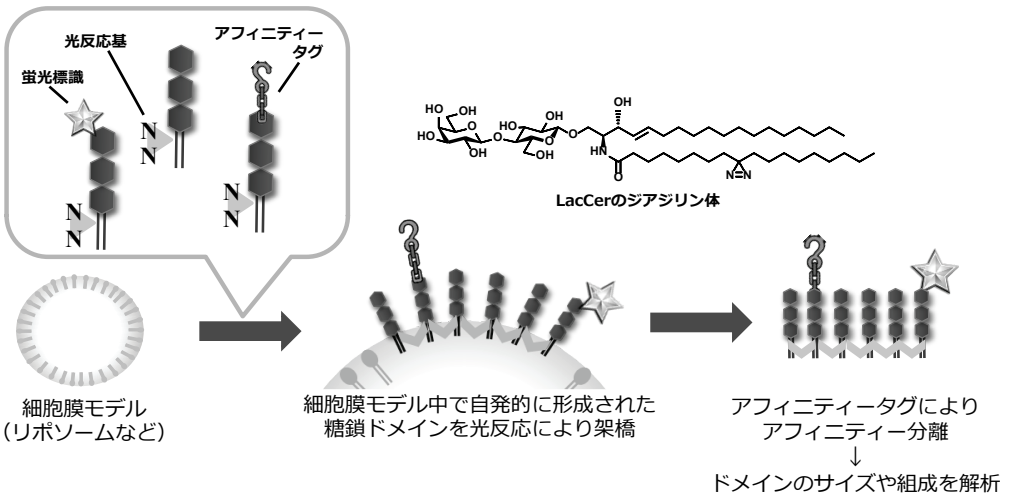
# 人工糖脂質ドメインの創製

# Development of an artificial glycolipid domain

○山口 英利子[1]、河村 奈緒子[1,3]、鈴木 健一[3]、安藤 弘宗[1,2,3]、今村 彰宏[1]、石田 秀治[1,2]、木曽 真[1,3] ([1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大・G-CHAIN、[3]京都大・iCeMS)
○Eriko YAMAGUCHI[1], Naoko KOMURA[1,3], Kenichi SUZUKI[3], Hiromune ANDO[1,2,3], Akihiro IMAMURA[1], Hideharu ISHIDA[1,2], Makoto KISO[1,3] ([1]Gifu Univ., [2]G-CHAIN, [3]iCeMS)

【目的】糖脂質に富んだ細胞膜微小領域（以降糖脂質ドメイン）は、脂質ラフトと同様に短寿命の機能性領域であり、細胞膜上に存在する糖脂質とコレステロールが集合して形成される。脂質ラフトはタンパク質受容体のオリゴマーを核として集合体が形成されるのに対し、糖脂質ドメインは糖脂質が主な構成分子である。糖脂質ドメインは、細胞内へのシグナル伝達のプラットフォームとして働いたり、単独で非ラフト性のタンパク質受容体（インスリン受容体や EGF 受容体等）の機能を制御するとされている。しかし、糖脂質ドメインは安定な状態で得ることが困難であるため、それ故分子レベルでの機能研究が進んでおらず、その形成機構や機能発現のしくみなどもあまり解明されていない。そこで、本研究ではその機能解析のために、安定な糖脂質ドメイン（擬似糖脂質ドメイン）を創製することを目的とした。

【方法・結果】安定化糖脂質ドメインを得るために、光反応基を有する糖脂質を細胞膜モデルへ導入し、自発的に形成された糖脂質ドメインを光反応により架橋する方法を考案した。糖脂質の架橋形成が脂質部分同士で起こるように、光反応基であるジアジリンを脂肪酸の中間の位置に導入することにした。また、ジアジリンをもつ脂肪酸の導入を合成の後半段階でできるよう、LacCer 構造から脂肪酸を除いたアミノ体（lyso-LacCer 保護体）を中間体とすることにした。そこで、2-$N_3$-スフィンゴシン（Sph）をアグリコンに有する Glc-Sph 受容体を合成し、この受容体と Gal 供与体との縮合反応により Lac-Sph 骨格を構築した。そして、$N_3$ 基の還元、及びジアジリンをもつ脂肪酸の導入、脱保護を経て、目的のジアジリン LacCer を得た。このジアジリン LacCer を用いて、二種類のリン脂質、コレステロールと共にリポソームを作製後、UV 照射を行ったところ、光反応により架橋された LacCer のダイマーの形成が見られた。




sphingoglycolipid, photoactive probe, nano-sized domain

発表責任者：安藤弘宗（hando@gifu-u.ac.jp）

講演番号：2C12a08
講演日時：3 月 18 日 11:15～ C 校舎 12 会場

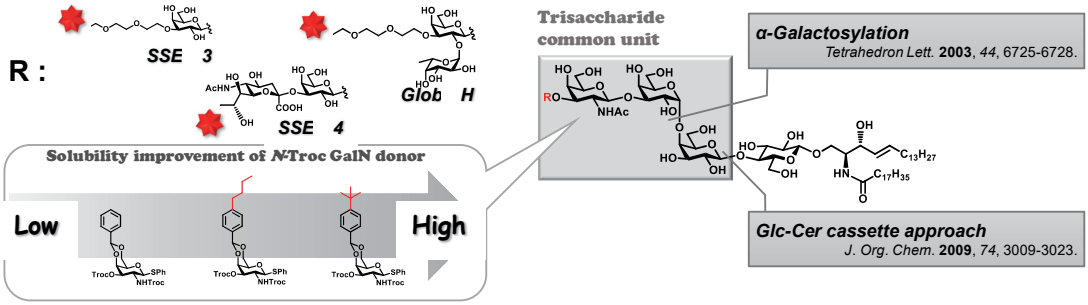
グロボ系ガングリオシド蛍光プローブの合成
Synthesis of fluorescent probes of globo-series gangliosides

○浅野 早知[1]、山口 英利子[1]、河村 奈緒子[1,3]、安藤 弘宗[1,2,3]、今村 彰宏[1]、石田 秀治[1,2]、木曽 真[1,3] ([1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大・G-CHAIN、[3]京都大・iCeMS)
○Sachi ASANO[1], Eriko YAMAGUCHI[1], Naoko KOMURA[1,3], Hiromune ANDO[1,2,3], Akihiro IMAMURA[1], Hideharu ISHIDA[1,2], Makoto KISO[1,3] ([1]Gifu Univ., [2]G-CHAIN, [3]iCeMS)

【目的】
グロボ系ガングリオシドに属する SSEA-3、SSEA-4、Globo-H は、iPS/ES 細胞などの幹細胞や、乳癌細胞などの癌細胞の表面に特異的に発現する糖脂質であることが知られている。これらのガングリオシドの相互作用が幹細胞・癌細胞の分化の方向性を決定していると推測されるが、そのメカニズムについては未解明な点が多い。近年我々は、膜分子の挙動を直接観察する「一分子観察」を駆使した研究により、脂質ラフトにおけるガングリオシドの実態解明に成功しており[1]、細胞膜におけるガングリオシドの機能解明を進めている。本研究では、グロボ系ガングリオシドの細胞膜での動態を解明すべく、蛍光プローブの合成を行うこととした。

【方法・結果】
これまでの蛍光ガングリオシドプローブの機能評価を踏まえ、標識位置を糖鎖末端に設定した。三種類のプローブを効率的に合成するため、三糖共通ユニットを設計し、これに各末端部分、Glc-Cer の導入を行う経路を考案した。まず、三糖共通ユニットの合成に向け、Gal-Gal 受容体を構築した後、GalN 供与体の導入を行った。この際、4,6 位をベンジリデン基で保護した *N*-Troc GalN 供与体は種々の有機溶媒への溶解性が悪く大量合成には不向きであったが、ベンジリデン基の芳香環パラ位に分岐のアルキル鎖を導入したところ、溶解性を向上させることに成功した。その後、SSEA-3 末端 Gal 供与体の導入、Glc-Cer の導入を行い SSEA-3 骨格を得た後、保護基の除去、蛍光導入を行い、SSEA-3 プローブの合成を達成した。現在は、合成したプローブのラフト分子としての機能評価と共に、Globo-H 及び SSEA-4 プローブの合成を行っている。

[1] N. Komura. *et al Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12*, 402-410.




globo-series ganglioside, single molecule imaging, glycan interaction

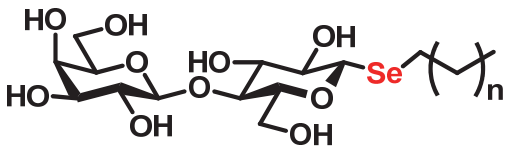
発表責任者：安藤　弘宗（hando@gifu-u.ac.jp）

講演番号：2C12a09
講演日時：3 月 18 日 11:30～ C 校舎 12 会場

膜蛋白質の X 線結晶構造解析に向けたセレノ糖脂質の開発
Development of seleno-glycolipid for X ray crystal structural analysis of membrane protein
○福尾 隼大[1]、鈴木 達哉[1,3]、安藤 弘宗[1,2,3]、今村 彰宏[1]、石田 秀治[1,2]、木曽 真[1,3] ([1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大・G-CHAIN、[3]京都大・iCeMS)
○Hayata FUKUO[1], Tatsuya SUZUKI[1,3], Hiromune ANDO[1,2,3], Akihiro IMAMURA[1], Hideharu ISHIDA[1,2], Makoto KISO[1,3] ([1]Gifu Univ., [2]G-CHAIN, [3]iCeMS)

我々の研究グループではこれまで、X 線結晶構造解析の位相決定法である多波長異常分散（MAD）法の有用性に着目し、多波長異常分散を示すセレン原子を糖鎖中に含むセレノ糖鎖プローブを用いた糖鎖-蛋白質複合体の新しい立体構造解析法の開発に取り組んできた。現在我々は、最も難しいとされる膜蛋白質の構造解析に有用なセレノ糖鎖プローブの開発を目指している。膜蛋白質の構造解析が困難な理由として、脂質二重膜外での環境で不安定化し、容易に変性することが挙げられる。この問題の解決策として、脂質二重膜においての分子環境をセレノ糖脂質を用い模倣することにより膜蛋白質を安定化させ、結晶化、MAD 法での構造解析を可能とする方法を着想した。しかし、セレノ糖脂質の効率的な合成法は未だ確立されていないため、本研究ではセレノ糖脂質の合成法の確立及び新規セレノ糖脂質の合成を目的とした。

まず初めに､オクチルセレノラクトシドの合成検討を行うこととした｡これまでの我々の研究グループの研究成果を参考に、イミデート糖と混合セレノアセタールを用いたアセタール交換反応により糖鎖へオクチルセレノ基を直接導入する方法と､アセタール交換反応により糖鎖へ 2-トリメチルシリルエチル（SE）セレノ基を予め導入した後に、フッ素アニオン存在下で SE 基をオクチル基と置換する方法の二通りの方法を検討した。その結果、前者の混合セレノアセタールを用いたアセタール交換反応によりオクチルセレノ基を糖鎖へ導入する方法がより効率的であることが判明した。さらに、この結果を参考に新規セレノ糖脂質として、炭素鎖長の異なるアルキルセレノラクトシドや脂質部位が二本鎖である B-30 セレノラクトシドを合成した。また、大型膜蛋白質である GPCR に対しても優れた安定化効果を示す Dodecyl MNG を模倣した、2 つの糖鎖部位と二本鎖のアルキル鎖からなるセレノ糖脂質を合成した。




n = 6,8,10,12,14,16,18

炭素鎖長の異なるアルキルセレノラクトシド

Se-glycolipid, Membrane protein, X ray crystal structural

発表責任者：安藤　弘宗（hando@gifu-u.ac.jp）

講演番号：2C12a10
講演日時：3 月 18 日 11:45～ C 校舎 12 会場

セレノ化フコース誘導体群の合成と蛋白質 X 線結晶構造解析への応用
Synthesis of seleno-fucose derivatives and their application for X-ray structural analysis of fucose lectin

○島袋 隼平[1,3]、牧尾 尚能[4]、鈴木 達哉[1,3]、安藤 弘宗[1,2,3]、今村 彰宏[1]、石田 秀治[1,3]、加藤 龍一[4]、木曽 真[1,3] ([1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大・G-CHAIN、[3]京都大・iCeMS、[4]高エネ機構・放射光)
○Junpei SHIMABUKURO[1,3], Hisayoshi MAKYIO[4], Tatsuya SUZUKI[1,3], Hiromune ANDO[1,2,3], Akihiro IMAMURA[1], Hideharu ISHIDA[1,3], Ryuichi KATO[4], Makoto KISO[1,3] ([1]Gifu Univ., [2]G-CHAIN, [3]iCeMS, [4]KEK-PF)

【目的】糖鎖が高次機能を発現する際には蛋白質との複合体形成を経るため、その機能発現機構を分子レベルで理解するためには、糖鎖－蛋白質複合体の立体構造情報の取得が重要となる。これまでに当研究室では、セレン原子の異常分散効果を位相決定に利用する多波長および単波長異常分散法(MAD/SAD 法)に着目し、糖分子に含まれている水酸基をメチルセレノ基(MeSe)で置換したセレノ化糖の化学合成およびそれらをリガンドかつ位相決定分子として利用した糖－蛋白質複合体の X 線結晶構造解析を行い、糖認識蛋白質の立体構造解析におけるセレノ化糖の有用性を見出している[1]。しかし、共結晶化の成否がセレン原子の導入位置に依存するという知見を得ており、基質認識機構が未解明な蛋白質へのセレノ化糖の利用は、調製したセレノ化糖が蛋白質に対して低親和性を示す可能性があるという点において潜在的な問題を有する。そこで多様な標識パターンを持つセレノ化糖群を合成し、それらを試行的に共結晶化へ供することの有用性を検証することとした。本発表では、2014 年度の大会[2]で未報告の 3-MeSe-Fuc の合成およびセレノ化フコース誘導体群とフコースレクチン AOL との共結晶構造解析、親和性測定試験の結果について報告する。

【方法・結果】セレノグリコシドは混合セレノアセタールのオキソカルベニウムイオンへの転移反応[3]により調製し､そのほかの置換体は脱離基を有するエピマ―に 4-メチルセレノ安息香酸誘導体を作用させ得られた。合成した化合物をフコース結合蛋白質 AOL との共結晶化、X 線結晶構造解析、そして表面プラズモン共鳴(SPR)を利用した結合親和性測定へ供しセレン原子導入位置の相違による影響を検証した。その結果、1 位置換体(α-, β-MeS-Fuc)および 2 位置換体(2-MeSe-Fuc)を用いた場合において共結晶化および立体構造決定に成功した。また、フコース誘導体と AOL との親和性測定の結果、3-MeSe-Fuc、4-MeSe-Fuc の親和性は、その他の誘導体に比べ 4 倍以上低下しており、構造解析の結果から予想される基質認識機構を支持する結果が得られた。以上の結果より、糖鎖認識機構が未解明である蛋白質に対するセレノ化糖群の有用性および共結晶化に向けたセレン標識糖鎖プローブ探索の一次スクリーニングとして SPR の使用可能性が見出された。

[1] Suzuki, T. *et al. Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 2090.
[2] 2014 年度大会 3A02p23
[3] Suzuki, T. *et al. Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 1920.

Selenoglycoside, Lectin, X-ray crystal structural analysis

講演番号：2C12p02
講演日時：3 月 18 日 14:15～ C 校舎 12 会場

# 可溶性担体と ODS の相互作用を利用した分子内環化ペプチドの合成
# Intramolecular Peptide Cyclization Using Soluble-Tag and ODS Interaction

○山上 紗弓理、大神 啓介、藤田 裕子、岡田 洋平、北野 克和、千葉 一裕（東農工大院）
○Sayuri YAMAGAMI, Keisuke OGAMI, Yuko FUJITA, Yohei OKADA, Yoshikazu KITANO, Kazuhiro CHIBA (Tokyo Univ. of Agric. and Tech.)

［目的］

環状ペプチドは酵素耐性や生物活性が高く、医薬品をはじめとした多くの分野に利用されている。環状ペプチドを得る方法には主に微生物からの単離と化学合成の二つが挙げられる。特に化学合成法では大スケールの合成やアミノ酸配列のデザイン、側鎖などの修飾が可能という利点がある一方で反応効率がアミノ酸配列や残基数などに依存すること、分子間反応による 2 量体などの副生成物の生成が課題となっている。

我々はこれまでにベンジルアルコール誘導体を可溶性担体(TAG)として用いた液相ペプチド合成法(TAG 法)を開発し Head-to-Tail 型環状ペプチドの合成に成功した。しかしこの研究では環化前の C 末端脱保護時の塩基処理によるエピマー化の可能性が存在する。そこで本研究では C 末端保護基の変更によりこの課題の解決と、先行研究にて明らかとなっているアルコキシ鎖と ODS シリカゲルとの相互作用によるシリカゲル上への TAG の担持効果を利用した分子内環状ペプチドの効率的合成法の確立を目的として研究を行うこととした。

［方法と結果］

本法では弱酸により容易に脱保護できる TAG1 を C 末端に導入し、TAG 法によって直鎖ペプチドを合成した。この際反応点となる両末端に対する ODS シリカゲルによる立体障害などの影響を最小限に抑えるために配列中央のアミノ酸の N 上に TAG1 よりも酸耐性の強い TAG2 を導入した。続いて C 末端 TAG1 と N 末端 Fmoc 基の脱保護を行い、環化反応に供した。種々の条件検討を行い、LC-MS を用いて目的とする分子内環化ペプチドと分子間反応によって得られる副生成物(2 量体ペプチドなど)の生成割合を比較した。ODS シリカゲルに担持して環化した場合において、他の条件と比較して高い選択性で分子内環化ペプチドが得られることが確認された。

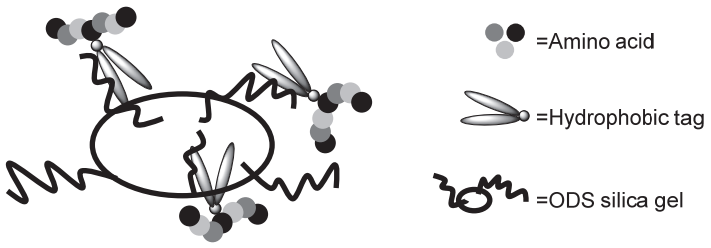



Fig.1 TAG のアルコキシ鎖と ODS シリカゲルの相互作用のイメージ

cyclic peptide, ODS silica gel, soluble tag

講演番号：2C12p03
講演日時：3 月 18 日 14:30～ C 校舎 12 会場

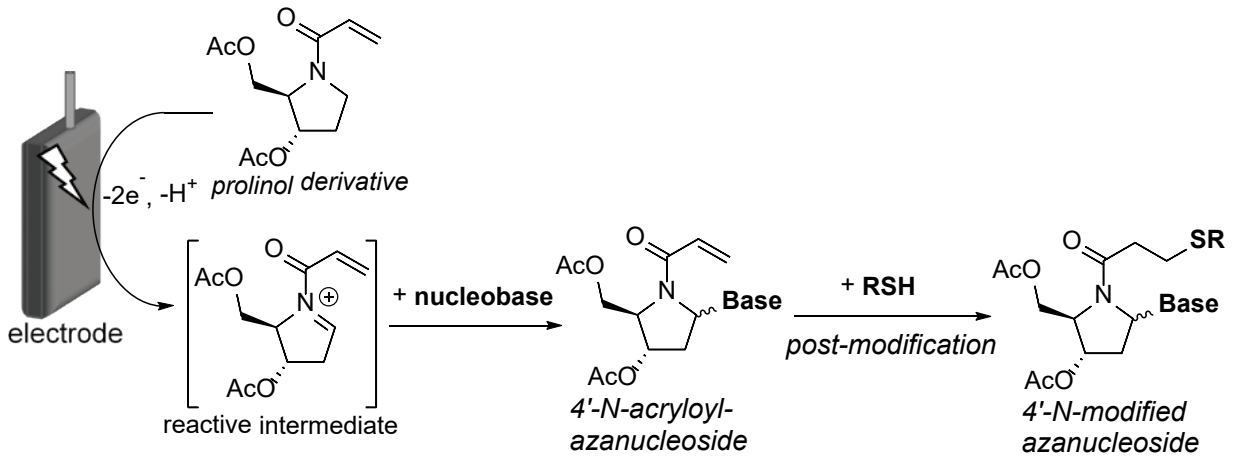
# 4'-N 修飾 azanucleoside の電気化学的合成法の開発

Development of electrochemical synthetic method for 4'-nitrogen modified azanucleosides

○中野 祐太、小路 貴生、原谷 涼奈、金 承鶴、千葉 一裕（東農工大農）
○Yuta NAKANO, Takao SHOJI, Suzuna HARAYA, Shokaku KIM, Kazuhiro CHIBA (Tokyo Univ. of Agric. and Tech.)

【目的】Azanucleoside は 4′位に窒素(N)原子を持つ核酸アナログであり，抗 HCV 活性等有用な生理活性を持つ他，4′位 N 原子の修飾により多様な構造・機能を持つ誘導体へ変換できる可能性を有している．しかし既存の azanucleoside 合成法は多段階の反応を要するため官能基許容性が低く，また azanucleoside の 4′位 N 原子上のアミド基の変換により azanucleoside が分解してしまうため 4′位 N 原子上に多様な修飾を持つ azanucleoside の合成は困難であった．この課題を解決すべく，本研究では有機電解反応を用いて 4′位 N 原子をポスト修飾可能な azanucleoside を合成する新規手法を開発した．

【方法と結果】1.0 M 過塩素酸リチウム - ニトロアルカン，50 mM 酢酸混合溶液を反応溶媒として用い化合物 *N*-acryloylprolinol 誘導体を陽極酸化した後に，核塩基を含む種々の求核剤を反応溶液に添加しワンポットでカップリング反応を行った．その結果，prolinol 誘導体の 5 位炭素選択的に求核剤が導入され, 目的の azanucleoside を得ることができた. また, 反応に用いるニトロアルカン溶媒を $MeNO_2$ から $EtNO_2$ に変更することで prolinol 誘導体の酸化電位が低下し prolinol 誘導体の陽極酸化における電流効率を改善し，azanucleoside の収率を 80~90%程度まで向上させることに成功した．さらに，得られた azanucleoside の 4′位 *N*-acryloyl 基上でチオールとの共役付加反応を行うことで，4′位窒素原子上に修飾が施された azanucleoside を高収率で得ることができた．以上より，有機電解反応を用い prolinol 誘導体からワンポットで 4′-*N*-acryloyl 基を持つ azanucleoside を合成し, さらに 4′位窒素原子を高効率にポスト修飾可能な新規 azanucleoside 合成法を開発することができた．



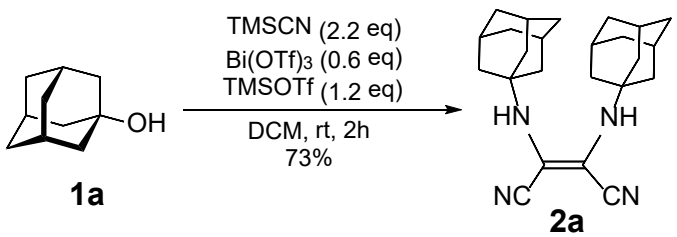

azanucleoside, anodic oxidation, post modification

講演番号：2C12p04
講演日時：3 月 18 日 14:45～ C 校舎 12 会場

アルコールからのビス（アルキルアミノ）マレオニトリル化合物の合成
Direct Synthesis of Bis ( alkylamino ) maleonitriles from Alcohols and TMSCN with Bi(OTf)3

○黒田 湧[1]、岡田 郁[1]、福田 拓也[1]、野口 恵一[2]、千葉 一裕[1]、北野 克和[1] ([1]東農工大院農、[2]東農工大院機器分析施設)
○Yu KURODA[1], Iku OKADA[1], Takuya FUKUDA[1], Keiichi NOGUCHI[2], Kazuhiro CHIBA[1], Yoshikazu KITANO[1] ([1]Tokyo Univ. of Agri. and Tech., [2]Tokyo Univ. of Agri. and Tech., Instrumentation Analysis Center)

【目的】ビス（アルキルアミノ）マレオニトリルはポルフィリン類縁体やヘテロ環化合物の合成原料となる重要な化合物である。これまでに当研究室ではアルコールからのイソニトリルの合成法を開発してきた。その過程において三級アルコールを基質として、ビスマス(III)トリフラート（$Bi(OTf)_3$）をルイス酸として用い、トリメチルシアニド（TMSCN）を反応させると、ビス（アルキルアミノ）マレオニトリル化合物の生成が確認された。一般的に、ビス（アルキルアミノ）マレオニトリル化合物はジアミノマレオニトリルから合成されるが、多段階を要し、三級アルキル基の導入は反応機構上困難である。また、アルコールを基質として一段階でビス（アルキルアミノ）マレオニトリル化合物を合成する方法は報告されていない。そこで本研究では、三級アルコールと TMSCN を用いて一段階のビス（アルキルアミノ）マレオニトリル化合物の合成法の確立を目指した。
【方法と結果】1-Adamantanol **1a** を基質とし、TMSCN を用いて 2,3-Bis(adamantylamino)maleonitrile **2a** の合成に関して金属試薬、溶媒、試薬等量の条件検討を行った。その結果、本反応は金属試薬として $Bi(OTf)_3$、また溶媒としてジクロロメタン（DCM）を用いることで効率的に進行することが観察された。一方、主な副生物としては基質のホルミルエステル体が確認された。これはアルコールと TMSNC の反応により生成するイミンに由来すると考えられた。そのため、カルボカチオンの発生が抑制され、収率が低下すると推測された。そこで、トリメチルシリルトリフラート（TMSOTf）を添加剤として加えたところホルミルエステル体の生成が抑制され、収率が向上することが観察された（**Scheme 1**）。次に、様々な官能基を有する直鎖状三級アルコールを用いた検討を行った結果、本反応はハロゲン、エーテル、エステル、フタルイミドを持つ化合物に適用可能であることが明らかとなった。




**Scheme 1**

Alcohol, Bis ( alkylamino ) maleonitrile, Bismuth

講演番号：2C12p05
講演日時：3 月 18 日 15:00～ C 校舎 12 会場

# 炭素環構造を持つユニークな糖 bradyrhizose の合成研究

# Synthetic Studies of Bradyrhizose, a Unique Carbocyclic Monosaccharide

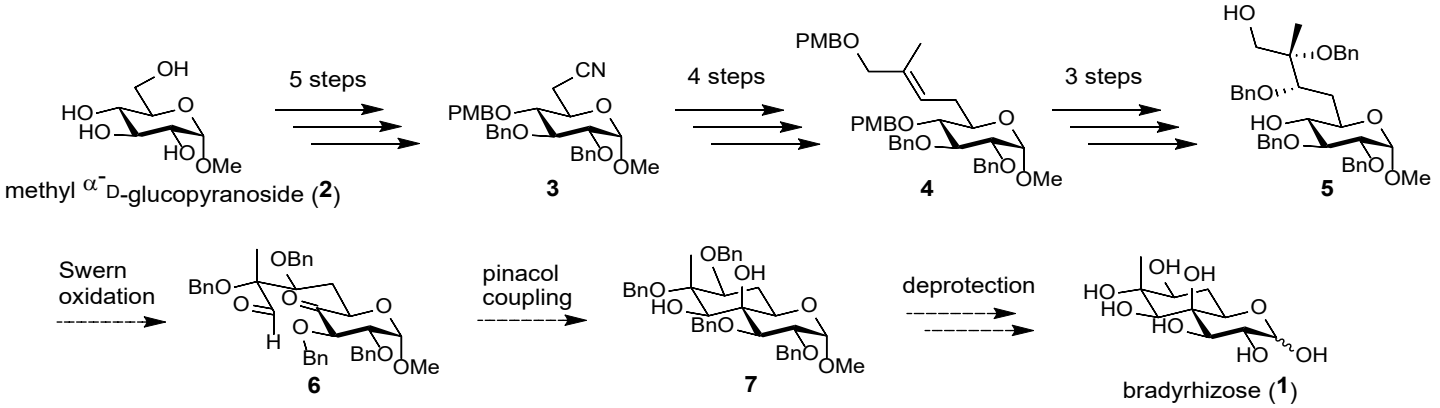
○今野 寛之、松島 芳隆（東京農業大学・生物応用化学科）
○Hiroyuki Konno, Yoshitaka Matsushima (Tokyo Univ of Agriculture, Dept of Applied Biology and Chemistry)

【背景・目的】

Bradyrhizose (**1**)は、2007 年に発見されたマメ科植物 *Aeschynomene indica*（クサネム）に共生する植物根粒菌 *Bradyrhizobium sp.*（BTAi1 株）の細胞壁多糖から単離された新規の糖である [1)]。この糖の機能はほとんど不明であり、全合成に関しても 1 例報告があるのみである [2)]。また、その合成は反応ステップ数が多く非効率的である。本研究では分子内 pinacol coupling を鍵反応とした bradyrhizose の効率的な合成ルートの確立を行うことを目的とする。

【方法・結果】

安価に入手可能な methyl α-D-glucopyranoside (**2**)を出発物質として、アルケン **4** までの合成について昨年本大会にて報告した [3)]。今回、アルケン **4** から Sharpless 不斉ジヒドロキシル化を含む三工程でジオール **5** を得た。その後の Swern 酸化によるケトアルデヒド **6** への変換、分子内 pinacol coupling の検討など詳細を併せて報告する予定である。




1) A. Silipo *et al*. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 12610-12612.
2) W. Li *et al*. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 6964-6967.
3) 今野寛之, 松島芳隆 日本農芸化学会 2016 年度大会 4B079

carbocyclic monosaccharide, bradyrhizose, synthesis

発表責任者：松島 芳隆（ym205308@nodai.ac.jp）

講演番号：2C12p06
講演日時：3 月 18 日 15:25～ C 校舎 12 会場

# オートファジー誘導物質(+)-Epogymnolactam の合成研究

# Synthetic Studies of (+)-Epogymnolactam, an Autophagy Inducer

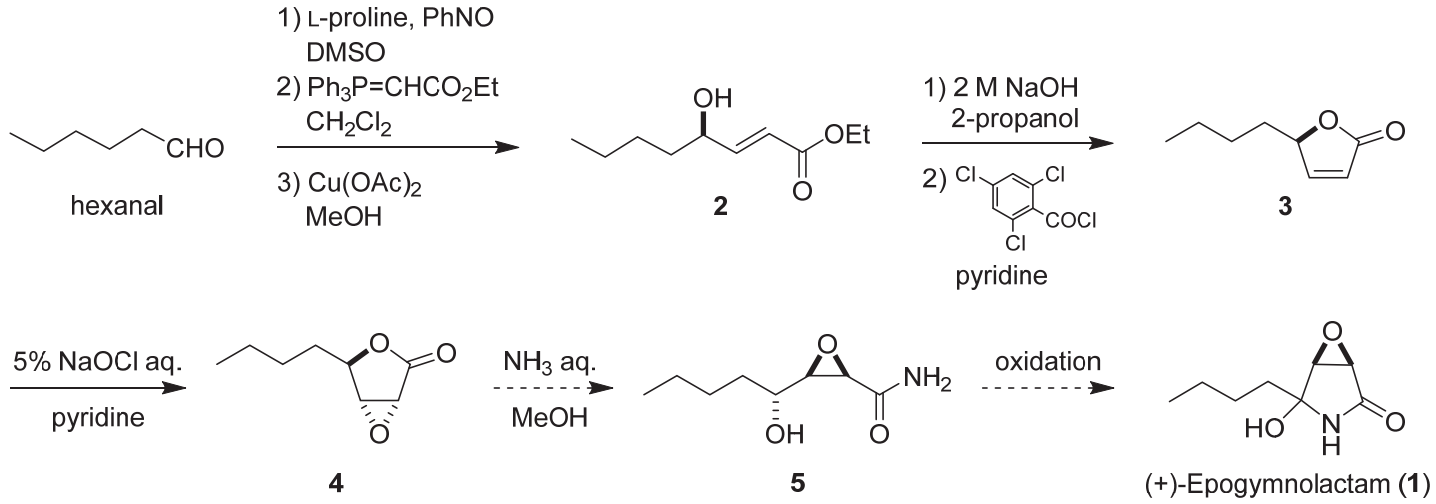
○堀越 敬介、尾形 健、松島 芳隆（東京農業大学・生物応用化学科）
○Keisuke Horikoshi, Ken Ogata, Yoshitaka Matsushima (Tokyo Univ of Agriculture, Dept of Applied Biology)

【背景・目的】

(+)-Epogymnolactam (**1**)は、モリノカレバタケ属の一種 *Gymnopus sp.*から単離、構造決定されたオートファジー誘導物質である [1)]。現在のところ、その全合成は 1 例のみが報告されている [2)]。本研究は(+)-epogymnolactam のより効率的な合成ルートの確立を目的とする。

【方法・結果】

ヘキサナールを出発物質として、L-プロリンを触媒としたアルデヒド基のα位のアミノオキシ化、Wittig 反応、N-O 結合の切断を one-pot で行い光学活性エステル **2** を得た。**2** は加水分解後、ラクトン **3** へと変換した。その後、**3** を文献 [2)]に報告されている合成中間体エポキシラクトン **4** に導いた。**4** から(+)-epogymnolactam(**1**)への変換は既知であるが、それらを併せて合成の詳細について報告する予定である。




1) S. Mitsuhashi, C. Shindo, K. Shigetomi, T. Miyamoto, M. Ubukata *Phytochemistry* **2015**, *114*, 155-159.
2) Y. Okado, K. Shigetomi, S. Mitsuhashi, M. Ubukata *J. Antibiot*. **2015**, *68*, 721-724.

(+)-Epogymnolactam, autophagy, synthesis

発表責任者：松島 芳隆（ym205308@nodai.ac.jp）

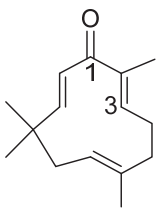
講演番号：2C12p07
講演日時：3 月 18 日 15:40～ C 校舎 12 会場

# Zerumbone の多様な反応性を利用した渡環反応制御による新規骨格形成

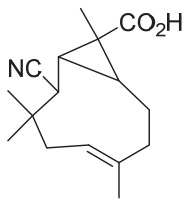
Annelation reaction of zerumbone showing its diverse reactivity

○宇高 芳美[1]、福島 美幸[1]、河合 靖[2]、北山 隆[1] ([1]近畿大院・農・バイオ、[2]長浜バイオ大)
○Yoshimi UTAKA[1], Miyuki FUKUSHIMA[1], Yasushi KAWAI[2], Takashi KITAYAMA[1] ([1]Major. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agric. Kindai Univ., [2]Nagahama Institute Bioscience and Technology)

**【緒言】**ゼルンボン **1** は、ショウガ科ショウガ属に属するハナショウガの根茎部が乾燥重量当たり 3~4%含有する 11 員環フムレン型セスキテルペンである。共役二重結合、孤立二重結合、カルボニル基をもち非常に高い反応性を示すことから「多様な反応性をもつ天然材料を利用した有機合成 (*NMRDOS*)」 の材料として優れている。この中でも、ゼルンボンから誘導した 2,3-ジブロモゼルンボンの KCN 処理で特徴的な 3–9 員環骨格をもつシクロプロパンカルボン酸 **2** への骨格変換がある[1]。これはゼルンボンの柔軟な反応性を示す好例で、特殊な反応剤を用いることなく未だ知られていないダイナミックな変換反応により、新しい骨格を構築できることを示し、天然物にはこのような化学反応を示すものが無数に存在している可能性を示唆している。本研究では特にこの反応に焦点をあて、その多様な反応性について報告する。



Zerumbone
**1**



Cyclopropanecarboxylic acid
**2**

**【結果】** 2,3-ジブロモゼルンボンを用いて求核剤や溶媒など、様々な反応条件下で検討した結果、3–9 員環骨格以外に劇的な骨格変換が起こることを見いだした。すなわち、これまでに見いだされていた 3–9 員環骨格や環開裂体だけでなく、多置換単環式 6 員環化合物、アジリジン、さらに合成上困難なシクロブタノン骨格をもつ 4–8 員環二環式化合物の合成に初めて成功し、また高選択的につくり分ける条件を見いだした。具体的には、メチルアミンのような比較的立体障害の小さい求核種を用い、アプロティック極性溶媒である DMSO を用いると、4–8 員環骨格はほとんど生成せず、3–9 員環骨格が主生成物として得られた。6 員環は、3–9 員環骨格が得られるときに競争的に生成し、溶媒にアプロティック中極性溶媒である THF を用いるとアジリジンが主生成物として得られた。一方、立体障害の大きいアミンを用いた場合は、中間体の構造決定により、Michael 付加後、4 員環を中間体として 4–8 員環骨格が優先的に生成し、アミンのかさ高さにより非常に影響されることが明らかとなった。以上のように、ゼルンボン誘導体が僅かな条件の違いによってダイナミックに構造変化することを明らかとした。

1. Kitayama, T. et al. *J. Org. Chem.*, **1999**, *64,* 2667–2672.

Zerumbone, *Zingiber zerumbet*, Diversity

講演番号：2C12p08
講演日時：3 月 18 日 15:55～ C 校舎 12 会場

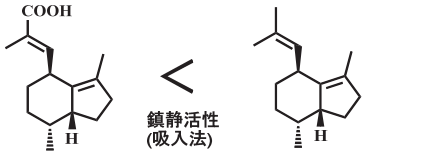
# Valerena-4,7(11)-diene およびその類縁体の合成検討

# Synthetic study of Valerena-4,7(11)-diene and its analogues

○谷藤 翔治[1]、金 成優[1]、種田 圭悟[2]、伊豆 友香子[1]、白井 貴士[1]、妻形 博紀[1]、宇高 芳美[1]、北山 隆[1] ([1]近畿大院・農・バイオ、[2]近畿大・農・バイオ)
○Shoji YATO[1], Seong Woo KIM[1], Keigo TANEDA[2], Yukako IZU[1], Takashi SHIRAI[1], Hiroki TSUMAGATA[1], Yoshimi UTAKA[1], Takashi KITAYAMA[1] ([1]Major. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agric. Kindai Univ., [2]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agric. Kindai Univ.)

【緒言】

西洋カノコソウ (*Valeriana officinalis* L.) は日本全土に分布するオミナエシ科の植物で、古くから西洋から東南アジアにかけて、鎮静や抗ヒステリー活性を示す生薬として用いられてきた。*V. officinalis* の根茎部は、主成分として Valerenic acid (**1**) を含有し、マウスを用いた吸入接種による鎮静活性評価で、**1** は濃度依存的に強い活性を示すため[1]、吸入接種法はストレスの少ない接種法として、経口投与の困難な患者にも使用できるなど広範な活用が期待できる。また、**1** のカルボキシル基がメチル基に置換した Valerena-4,7(11)-diene (**2**) は、炭化水素のみで形成される二環式セスキテルペンで、微量であるが根茎部中に含有し、**1** に比べより高い鎮静作用を示すことも分かった。このように、水素結合の強い官能基が全く存在しない構造体が強い生理機能を示すなど、生理活性発現のメカニズムに興味が注がれる。そこで、これらの立体化学を含めた構造活性相関研究を進めるため、当研究室では **1** および **2** の光学活性体および立体異性体合成、ならびにこれらの類縁体合成を検討してきた。目的物の合成をほぼ達成したが、低収率のステップが少なくないため、全工程にわたって効率的合成法を確立することを目的とした。今回は、特に構造活性相関研究に重要な異性化工程の反応機構を明らかにし、さらに最終工程についても収率の改善検討を行った。



Valerenic acid (1)　　Valerena-4,7(11)-diene (2)

【結果】

2-Cyclopentenone を出発物質として 3-Isopropenylcyclopent-2-enol を得た後、リパーゼ PS を触媒に用いたトランスエステル化により、(-)-3-Isopropenylcyclopent-2-enol (99% ee) と (+)-3-Isopropenylcyclopent-2-enol (96% ee)を得た。続く Diels-Alder 反応により鍵中間体である三環式ラクトンを合成し、LAH 還元、Crabtree 触媒による立体選択的水素添加を行い望みの立体を有したジオール体に変換した。次に、一級水酸基を選択的に保護し、IBX 酸化によりケトン体を得、続いて天然体と異性体を作り分ける鍵ステップとなるトリフラート(Tf)化について、基質濃度など反応条件を詳細に検討した。結果、天然体と異性体をそれぞれ選択的に生成する条件を見いだすことに成功した。

1. Ito, M. *et al.*, *J. Nat. Med.* **2009**, *63*, 380-385.

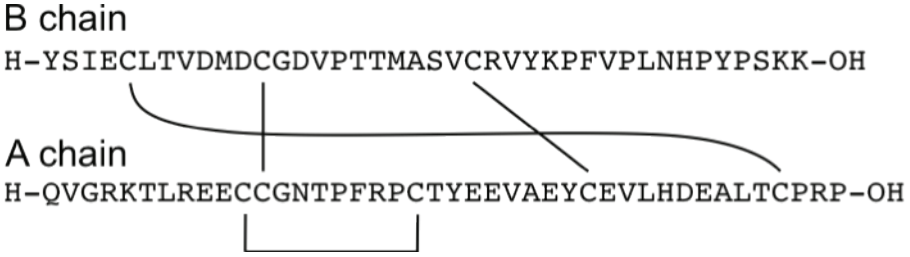
Valerenic acid, Sedative Activity, Natural product

発表責任者：北山隆（kitayama@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：2C12p09
講演日時：3 月 18 日 16:10～ C 校舎 12 会場

イソスジエビ *Palaemon pacificus* のインスリン様ペプチドの化学合成
Chemical synthesis of the insulin-like peptide from shrimp, *Palaemon pacificus*
○片山 秀和[1]、向中野 貴史[1]、小暮 純也[2]、大平 剛[2,3] ([1]東海大工・生命化学、[2]神奈川大院理・理学、[3]神奈川大理・生物)
○Hidekazu KATAYAMA[1], Takafumi MUKAINAKANO[1], Junya KOGURE[2], Tsuyoshi OHIRA[2,3] ([1]Tokai Univ., [2]Graduate Sch. Sci., Kanagawa Univ., [3]Kanagawa Univ.)

【背景・目的】甲殻類動物において、造雄腺ホルモン（AGH）は雄性化の鍵となる内因性因子であり、生長の過程で AGH が生体内に存在するとオスへと性分化する。AGH の構造はオカダンゴムシ *Armadillidium vulgare* においてはじめて決定され、インスリン様ヘテロ二量体ペプチドであることが明らかになった。近年、我々はクルマエビ *Marsupenaeus japonicus* のインスリン様ペプチドの化学合成と機能解析を通じて、エビ類においてもインスリン様ペプチドが AGH として機能していることを見出した。オカダンゴムシとクルマエビの AGH は、いずれも *N*-結合型糖鎖が付加した糖ペプチドであり、これらの糖鎖が生物活性に必須であった。しかし、糖鎖付加部位は甲殻類動物間で保存されておらず、イソスジエビ *Palaemon pacificus* においては *N*-結合型糖鎖付加モチーフが配列中に存在していない。そのため、甲殻類におけるインスリン様ペプチドの構造と機能との関係に興味が持たれる。そこで本研究では、イソスジエビ由来のインスリン様ペプチドを化学合成することとした。
【結果・展望】イソスジエビのインスリン様ペプチドは、他のインスリンファミリーペプチドと異なり、A 鎖内に 1 対、A-B 鎖間に 3 対の計 4 対のジスルフィド結合が存在していると考えられている（下図）。2 本のペプチド鎖間に 3 対のジスルフィド結合を位置選択的に形成した合成例は、これまでに報告が無い。位置選択的なジスルフィド結合の形成には、直交性を有する Cys 残基側鎖保護基がジスルフィド結合の数だけ必要となる。イソスジエビのインスリン様ペプチドの合成には、Cys 残基側鎖保護基として、クルマエビ由来のペプチドの合成に使用した trityl 基、*p*-methoxybenzyl 基、acetamidomethyl 基のほかに、*tert*-butyl 基を使用した。常法によるペプチドの固相合成の後、これら保護基の脱保護と酸化を順次行うことにより、目的とするペプチドの合成を達成した。今後、生物検定を行うことにより、甲殻類におけるインスリン様ペプチドの構造と機能との関係の一端が明らかになるものと期待される。




androgenic gland hormone, insulin-like androgenic gland factor, *Palaemon pacificus*

発表責任者：片山秀和（katay@tokai-u.jp）

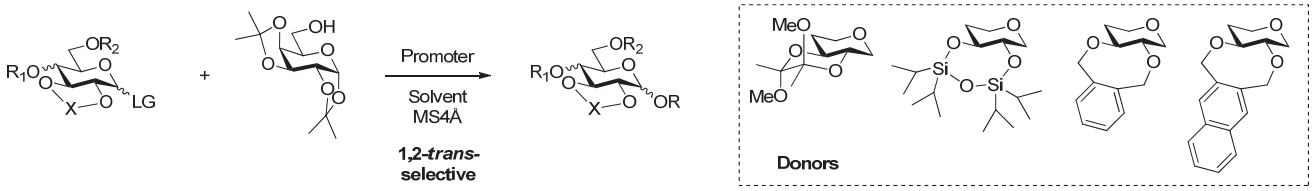
講演番号：2C12p10
講演日時：3 月 18 日 16:25～ C 校舎 12 会場

2,3-環状保護糖供与体を用いた 1,2-*trans*-選択的グリコシド化の検討
Examination of 1,2-*trans*-selective glycosidation of glycosyl donors bearing 2,3-cyclic protecting group

○八神 なほ子[1,3]、小西 美紅[1,3]、玉井 秀樹[1,3]、植木 章晴[1,3]、今村 彰宏[1]、安藤 弘宗[1,2,3]、石田 秀治[1,2]、木曽 真[1,3] ([1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大・G-CHAIN、[3]京都大・iCeMS)
○ Nahoko YAGAMI[1,3], Miku KONISHI[1,3], Hideki TAMAI[1,3], Akiharu UEKI[1,3], Akihiro IMAMURA[1], Hiromune ANDO[1,2,3], Hideharu ISHIDA[1,2], Makoto KISO[1,3] ([1]Gifu Univ., [2]G-CHAIN, [3]iCeMS)

【背景・目的】立体選択的グリコシド化は、効率的な糖鎖合成において鍵となる反応である。現在、1,2-*trans*(β)-選択性を示す立体制御法としては、隣接基効果やニトリル溶媒効果が一般的に用いられている。しかし、これらの方法は一定の選択性を発揮するものの、種々の課題が残されている。特に、アシル系保護基を利用する隣接基効果においては、しばしば、オルソエステルの副生やアシル基の転移がみられる。また、分子内にエステル部位を有する糖鎖を合成する際は保護基の変換等が必要となる。そのため、実用的且つ効率的な合成戦略を立案するためには、隣接基効果に依らない立体制御法の拡充が望まれる。近年、隣接基効果に依らない立体制御法として、環状保護基が立体制御に有効に働くという知見が得られている。そこで、本研究では、環状保護基を糖供与体のアノマー位近傍に配置させることで立体選択性を得ようと着想し、2,3 位に環状保護基を導入した糖供与体を用い、グリコシド化反応における立体選択性の検証を行なうこととした。2014 年度大会[1]において、グルコピラノースの 2,3 位水酸基に環状保護基を用いることで、1,2-*trans*-選択的にグリコシド化が進行するという事を報告した。今年度は、環状保護基を有する様々な糖供与体を用いたグリコシド化反応に関する詳細な検証、NMR による構造解析、更に糖鎖合成への利用を視野に入れた検証も行った。
【方法・結果】グルコース誘導体の 2,3 位水酸基に様々な大きさの環状保護基を導入した糖供与体を合成し、グリコシド化に供した。その結果、6 から 8 員環を有する糖供与体において、低温にて高い収率と 1,2-*trans*-選択性が得られた。また、詳細な検証を行なった結果、立体選択性は反応温度及び糖供与体の 4,6 位水酸基保護基、糖受容体の構造による影響を受け、ルイス酸及び脱離基を変更することで選択性が向上することも明らかとなった。また、*o*-Xylylene 型供与体に関して NMR を用いた配座解析を行った結果、-80℃にて $^4H_3$ 配座をとることが示唆された。更に、*o*-Xylylene 基のベンゼン環をナフタレンに置換した糖供与体においては、酸性条件にて選択的除去が可能であることが見出され、糖鎖合成への応用が可能であることが示唆された。本発表ではこれらの詳細について報告する。

[1] 日本農芸化学会 2014 年度大会 3A02p19




Cyclic protecting group, Stereoselectivity, Glycosylation

発表責任者：安藤弘宗（hando@gifu-u.ac.jp）

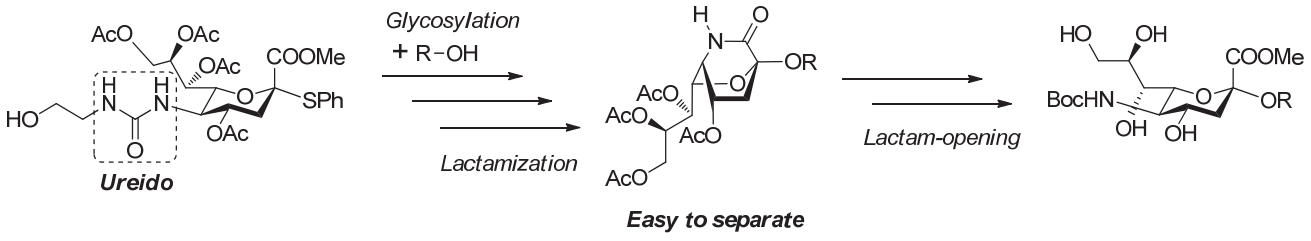
講演番号：2C12p11
講演日時：3 月 18 日 16:50～ C 校舎 12 会場

# 5 位 Ureido 型シアル酸供与体の開発とシアロ糖鎖合成への展開

# Development of a 5-ureido-modified sialyl donor and application for the synthesis of sialoglycans

○棚瀬 舞子[1]、今村 彰宏[1]、安藤 弘宗[1,2,3]、石田 秀治[1,2]、木曽 真[1,3]（[1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大・G-CHAIN、[3]京都大・iCeMS）
○Maiko TANASE[1], Akihiro IMAMURA[1], Hiromune ANDO[1,2,3], Hideharu ISHIDA[1,2], Makoto KISO[1,3] ([1]Dept. of Applied Bioorganic Chemistry, Gifu Univ., [2]G-CHAIN, Gifu Univ., [3]Institute for Integrated Cell-Material Sciences (WPI-iCeMS), Kyoto Univ.)

シアロ糖鎖の化学合成を指向した場合、シアリル化反応における立体制御や煩雑な精製工程が大きな課題となる。本研究ではこれらの課題を克服し、効率的かつ実用的なシアロ糖鎖合成法の確立を目指し、新規シアル酸供与体の開発を行うこととした。本研究における鍵反応は、「α-シアロシドのみを特異的に分離可能とするラクタム化反応」であり、これにより反応混合物からα-体を単一化合物として容易に取り出すことができる。しかし、ラクタム化の際にアシル系保護基が脱離してしまうという合成戦略上深刻な課題が残されていた。そこで、本研究では 5 位に Ureido 基を有するシアル酸供与体を新たに設計、合成することでラクタム化におけるアシル基の脱離を抑制できると考えた。また、5 位に Ureido 基を有するシアル酸供与体はこれまでに報告例がないため、シアリル化反応における反応性や立体選択性に関する知見がない。そのため、まず新規誘導体の糖供与体としての有用性を確認することとした。簡便に調製した新規 5 位 Ureido 型供与体を様々な反応条件下で縮合反応に供したところ、活性剤に IBr-AgOTf を用い、EtCN 溶媒中、-80℃で行う条件が最適であることが分かった。また、受容体の構造による収率および立体選択性への影響を調査したところ、二級水酸基をもつ受容体を用いた場合に最も収率が高く、α-選択性も高くなる結果を得た。しかし、立体異性体であるβ-体の生成は避けられなかったため、ラクタム化によるα-シアロシドの分離を試みた。ここでは、縮合成績物の混合物を比較的温和な条件下でラクタム化反応に供することでα-シアロシドのみをラクタム体として単離した。この際、狙い通りアシル基の脱離は見られず、従来の課題を克服することに成功した。これは、シアル酸の 5 位に Ureido 基があることで、従来法とは異なる機構でラクタム化が進行するためだと考えられる。従来法ではアミンを遊離させた後にラクタム環が形成するのに対して、本手法ではまずラクタム環の形成が起こり、その後 Ureido が 2-オキサゾリジノンとして脱離することでアシル系保護基に影響を与えることなく目的のラクタム体が得られると考えている。最後に、応用展開として天然に存在するシアロシドの合成を行い、本手法の有用性を確認した。

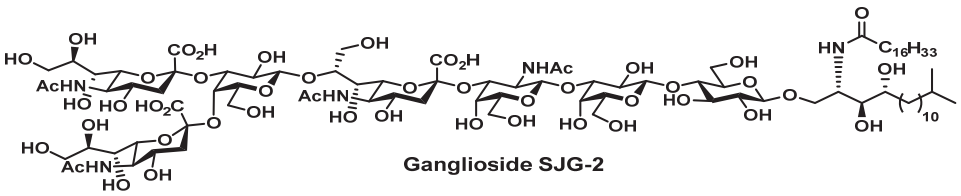



Sialic acid, Glycosylation, Lactamization

講演番号：2C12p12
講演日時：3 月 18 日 17:05～ C 校舎 12 会場

特異なシアル酸配列を有するガングリオシド SJG-2 の全合成研究
Synthetic study on ganglioside SJG2 having a unique sialic acid sequence
○真野 寛之[1]、大山 龍太郎[1]、坂本 紘一[1]、安藤 弘宗[1,2,3]、今村 彰宏[1]、石田 秀治[1,2]、木曽 真[1,3]
([1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大・G-CHAIN、[3]京都大・iCeMS)
○Hiroyuki MANO[1], Ryutaro OHYAMA[1], Kouichi SAKAMOTO[1], Hiromune ANDO[1,2,3], Akihiro IMAMURA[1], Hideharu ISHIDA[1,2], Makoto KISO[1,3] ([1]Gifu Univ., [2]G-CHAIN, [3]iCeMS)

【目的】ガングリオシドは分子内にシアル酸を含むスフィンゴ糖脂質の総称であり、細胞の分化・増殖・細胞間認識・免疫といった複数の生命現象に関わっている生体分子である。近年、棘皮動物から様々なガングリオシドが発見され、それらが神経細胞モデルであるラット副腎髄質由来褐色細胞 PC12 に対して強い神経突起伸展活性を示すことが明らかとなり、医薬品のシード化合物として注目されている。本研究では、これまでに調べられた棘皮動物由来ガングリオシドの中でも最も強い神経突起伸展活性を示したマナマコ由来ガングリオシド SJG-2 [1]に着目し、全合成を目指した。
【方法・結果】ガングリオシド SJG-2 の七糖骨格を非還元末端三糖、内部三糖、グルコシルセラミドの三ユニットに分けて合成を進めることとした。非還元末端三糖はガラクトース 3、4 位に嵩高いシアル酸二残基が結合しているという他に類を見ない特異な構造を有している。これは、シアル酸の嵩高さの点からガラクトースの 3、4 位水酸基付近が立体的に混み合うことが考えられ、合成が困難と予想される。また、非還元末端三糖のガラクトース 1 位水酸基は内部三糖のシアル酸 8 位に結合している。このことから、シアル酸 8 位水酸基の低反応性並びに非還元末端三糖の嵩高さから縮合反応を行う際に、収率の低下が懸念される。本研究ではシアル酸を 1,5-ラクタム化することで、配座をイス型配座から舟形配座へと変換し、嵩高さ及び 8 位水酸基の反応性の問題を解決できると考えた。非還元末端三糖および内部三糖は昨年度大会 [2]にて報告したラクタム化反応を鍵とする経路にて、良好な収率で合成した。続いて、合成した非還元末端三糖ユニット、内部三糖ユニットを供与体と受容体へと変換し、縮合反応に供した結果、高収率で六糖骨格を構築することができた。最後に、六糖骨格に含まれる三つのシアル酸を舟形配座であるラクタム体から天然に存在する形であるイス型配座に戻すことに成功した。また、グルコシルセラミドユニットは当研究室のこれまでの知見を活かし、効率的に合成を行った。現在は六糖供与体への変換を検討中である。




[1] M. Kaneko, F. Kisa, K. Yamada, T. Miyamoto, R. Higuchi, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 1004-1008.
[2] 日本農芸化学会 2016 年度大会,4I011

Ganglioside, Sialic acid, Echinoderm

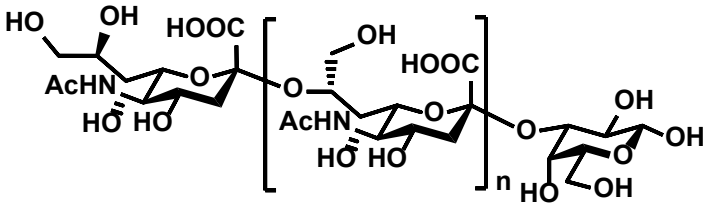
発表責任者：安藤弘宗（hando@gifu-u.ac.jp）

講演番号：2C12p13
講演日時：3 月 18 日 17:20～ C 校舎 12 会場

シアル酸多量体の合成研究
Synthetic study on oligosialic acid

○白崎 淳哉[1]、小西 美紅[1,3]、廣瀬 裕哉[1]、安藤 弘宗[1,2,3]、今村 彰宏[1]、石田 秀治[1,2]、木曾 真[1,3] ([1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大・G-CHAIN、[3]京都大・iCeMS)
○ Junya SHIRASAKI[1], Miku KONISHI[1,3], Yuya HIROSE[1], Hiromune ANDO[1,2,3], Akihiro IMAMURA[1], Hideharu ISHIDA[1,2], Makoto KISO[1,3] ([1]Gifu Univ., [2]G-CHAIN, [3]iCeMS)

【目的】シアル酸を含有する糖鎖には、シアル酸同士が 2 位,8 位水酸基間で縮合したα(2→8)シアル酸多量体を含むものがあり、神経細胞の発生や分化、神経回路形成などに関与していることが知られている。従来、α(2→8)シアル酸多量体はシアル酸の単独重合体であるコロミン酸を限定加水分解することにより調製されてきたが、この方法には均一な試料の安定供給が難しいなどの問題が存在する。そのため、シアル酸多量体を有する糖鎖の機能解明を進める上で、シアル酸単量体から均一なα(2→8)シアル酸多量体を合成するための方法論を確立する必要があり、本研究では、この課題に取り組んだ。
【方法・結果】イス型配座のシアル酸 8 位水酸基は 5 位アセトアミド基間、もしくは 1 位カルボキシル基間で水素結合を形成することから、求核性が著しく低下していることが報告されている。この課題に対し当研究室では、1 位カルボキシル基と 5 位アセトアミド基間で 1,5-ラクタム環を形成することにより、配座を舟形に固定させて水素結合を解消し、8 位水酸基の低反応性を改善する手法を見出した[1,2]。本研究では、この知見を基としたラクタム型シアル酸受容体を鍵ユニットとする合成経路を検討した。はじめに、5 位を NHTFA 基、9 位を Bn 基、4,7,8 位を Ac 基で保護したシアル酸供与体とガラクトース受容体をシアリル化反応に供し、シアリルガラクトース骨格を構築した。続いて得られたシアリルガラクトースの 8 位水酸基の反応性の向上のためのラクタム化、さらに三段階の保護基の変換を経てシアリルガラクトース受容体へと導いた。これを再度シアル酸供与体とシアリル化反応に供することで二量体を合成した。このように、シアリル化、ラクタム化、保護基の変換を繰り返し、長鎖α(2→8)シアル酸多量体の合成を検討したので、その詳細を報告する。




[1] H. Ando *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6759-6763.
[2] H. Tanaka *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 4478-4481.

Polysialic acid, glycosylation, lactamization

発表責任者：安藤弘宗（hando@gifu-u.ac.jp）

講演番号：2C12p14
講演日時：3 月 18 日 17:35～ C 校舎 12 会場

AE3 determinant 糖鎖の化学合成
Chemical synthesis of the AE3 determinant saccharide
○河合 一憲[1]、今村 彰宏[1]、安藤 弘宗[1,2,3]、石田 秀治[1,2]、木曽 真[1,3]（[1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大・G-CHAIN、[3]京都大・iCeMS）
○Kazunori KAWAI[1], Akihiro IMAMURA[1], Hiromune ANDO[1,2,3], Hideharu ISHIDA[1,2], Makoto KISO[1,3] ([1]Gifu Univ., [2]G-CHAIN, [3]iCeMS)

[背景]
AE3 抗体は上皮癌細胞上で強く発現する糖タンパク質糖鎖を特異的に認識することから、上皮癌の病理診断に有用とされている。しかし、AE3 抗体が結合する抗原部位、いわゆる AE3 determinant の分子構造は未だ特定されていない。そこで、本研究では、AE3 determinant 糖鎖の構造決定をめざし、その推測化合物の合成を目的とする。これまでの知見より、AE3 determinant 糖鎖は Gal-GalN-Gal-GlcN-GalN の五糖構造を有し、内部 Gal 3 位に硫酸基が結合していることが示唆された。そこで本研究では、還元末端に O-グリカンを模して Ser を結合させた五糖構造を標的化合物とした。
[方法・結果]
この標的化合物を合成するにあたり、非還元末端側二糖供与体と還元末端側三糖受容体の 2 つのユニットに分け、収斂的に合成する方法を採用した。また、最終脱保護工程において強塩基の使用は O-グリカンの脱離を引き起こすことが予想されるため、合成中間体の保護基として Bn 基を多用し、最終脱保護は温和な条件下、接触水素添加法により行うこととした。
まず、二糖供与体は GalN 2 位にアジド基を、4 位と 6 位に DTBS 基を有する受容体を用い、中程度の収率でβ選択的に合成することができた。また、還元末端の GalN と GlcN 間のβ結合はニトリル溶媒効果によって構築し、得られた GlcN-GalN と内部 Gal は DMTST 試薬を用いた縮合反応に供することで、効率的に三糖構造へと導いた。その後、保護基の変換を行い三糖受容体へ誘導した。そして、得られた二糖供与体と三糖受容体を縮合反応に供し、五糖構造を構築した後、DTBS 効果により、α選択的に Ser を導入した。最後に、硫酸基の導入および最終脱保護を行い、目的化合物の合成を達成した。

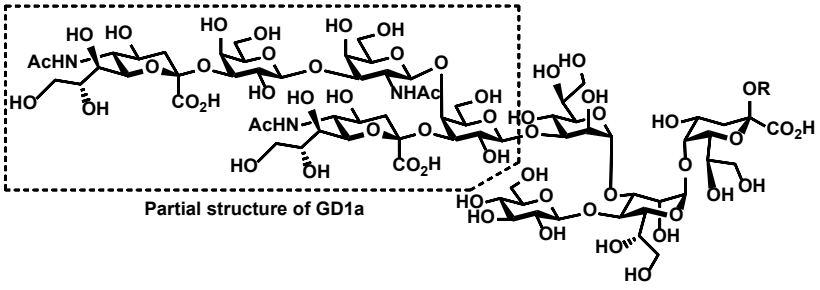
AE3 antibody, O-glycan, chemical synthesis

発表責任者：今村彰宏（aimamura@gifu-u.ac.jp）

講演番号：2C12p15
講演日時：3 月 18 日 17:50～ C 校舎 12 会場

自己免疫疾患関連リポオリゴ糖鎖の化学合成
Synthesis of lipooligosaccharide of *C. jejuni* associated with Guillain-Barre syndrome
○吉仲 宏揮[1]、今村 彰宏[1]、安藤 弘宗[1,2,3]、石田 秀治[1,2]、木曽 真[1,3]（[1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大・G-CHAIN、[3]京都大・iCeMS）
○Hiroki YOSHINAKA[1], Akihiro IMAMURA[1], Hiromune ANDO[1,2,3], Hideharu ISHIDA[1,2], Makoto KISO[1,3] ([1]Gifu Univ., [2]G-CHAIN, [3]iCeMS)

【目的】自己免疫疾患の一種である GBS（ギランバレー症候群)は、グラム陰性細菌である *C. jejuni* の先行感染により発症することが知られている。これは *C. jejuni* の細胞壁に存在するリポオリゴ糖鎖（LOS)の構造とヒトの末梢神経に存在するガングリオシドの構造が分子相同性を有しているため、感染源に対して産生されたはずの抗体が誤って自己の末梢神経まで攻撃することにより引き起こされると考えられている。しかしながら抗体の糖鎖認識における分子レベルでの詳細なメカニズムは未解明である。そこで本研究では GBS のさらなる発症機構の解明および新たな治療法開発の鍵となる LOS 九糖の化学合成を目指すこととした。
【方法・結果】目的とする LOS 九糖の合成にあたり、オリゴ糖鎖を還元末端側四糖と非還元末端側五糖に分割する戦略を立案した。まず、還元末端側四糖の合成に際し、マンノースから合成したヘプトースとグルコースを順次グリコシル化させることにより三糖を構築し、受容体へと変換した。次に市販のマンノフラノースを出発物質とし、RCM 法を用いて八炭糖である KDO を構築後、先の三糖とのグリコシル化を経て還元末端側四糖を合成した。続いて、非還元末端側五糖は更に三糖と二糖に分割して合成する戦略を立てた。非還元末端側五糖は分子内にシアル酸を有するガングリオシド GD1a の部分構造であることから、まずシアル酸とガラクトースからシアリルガラクトース（NeuGal)を調製し、これを共通ユニットとして供与体と受容体を各々合成した。次に NeuGal 受容体に *N*-アセチルガラクトサミンを導入し三糖を構築後、受容体へと変換した。続いて、NeuGal 供与体と三糖受容体をグリコシル化反応に供することで五糖骨格へ導いた。得られた非還元末端側五糖を供与体へと変換し、先に合成した還元末端側四糖とのグリコシル化を行い、目的とする九糖骨格の合成を達成した。現在、得られた LOS 九糖の脱保護を行っている。



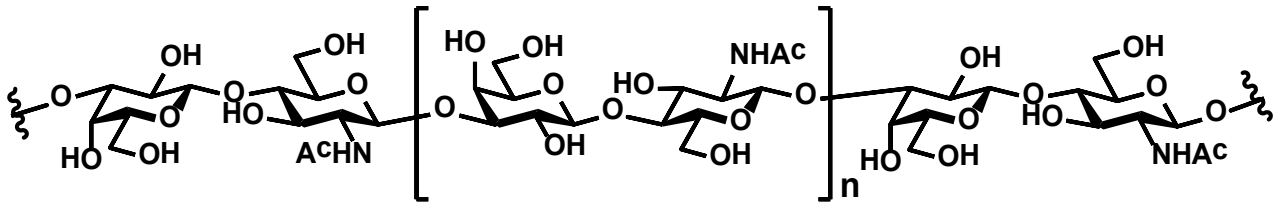
目的とする LOS 九糖の構造

Guillain-Barre syndrome, Lipooligosaccharide, Organic synthesis

講演番号：2C12p16
講演日時：3 月 18 日 18:05～ C 校舎 12 会場

Self-condensation 戦略によるポリラクトサミン化学合成法の開発
Development of self-condensation strategy for chemical synthesis of polylactosamine
○浅野 拓也[1]、今村 彰宏[1]、安藤 弘宗[1,2,3]、石田 秀治[1,2]、木曽 真[1,3]（[1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大・G-CHAIN、[3]京都大・iCeMS）
○Takuya ASANO[1], Akihiro IMAMURA[1], Hiromune ANDO[1,2,3], Hideharu ISHIDA[1,2], Makoto KISO[1,3] ([1]Gifu Univ., [2]G-CHAIN, [3]iCeMS)

【目的】ポリラクトサミンは、ガラクトース（Gal）と *N*-アセチルグルコサミン（GlcNAc）が β（1→4）結合した *N*-アセチルラクトサミン（LacNAc）を繰り返し構造とした多糖である。ポリラクトサミンは生体内において糖タンパク質や糖脂質上に存在し、他の糖と結合して特定の受容体に対するリガンドとして働く。そのため、生理活性物質が機能する土台となり様々な生命現象に関与している。しかし、現在、ポリラクトサミンに関する生物機能、メカニズムは十分には解明されていない。そこで本研究では、ポリラクトサミンの化学合成法を確立し、研究試料として生化学的研究に供することにより、ポリラクトサミンの詳細な機能を解明することを目的とする。
【方法・結果】ポリラクトサミンを化学合成するにあたり、分子内に脱離基と水酸基を有する四糖ユニットを合成し、それをグリコシル化反応に供することで、一挙に四糖ユニットを複数結合させたポリラクトサミン骨格を構築する戦略を立案した。また、その際に多数の副生成物が生じることが予想されるため、構築したポリラクトサミン骨格の精製を容易にすべく、アジド基を含むリンカーを有した五糖を還元末端ユニットとした。まず、四糖ユニットの合成に際し、市販のガラクトースとグルコサミン塩酸塩を出発物質として、ガラクトース供与体、グルコサミン受容体を合成しグリコシル化反応に供することでラクトサミン骨格を合成した。次に、合成したラクトサミン骨格に種々の変換を施しラクトサミン供与体、ラクトサミン受容体へと導いた後、グリコシル化させることにより四糖ユニットの合成を行った。得られた四糖ユニットにアジド基を含むリンカーを導入したガラクトースを結合させて還元末端五糖へと誘導し、先に合成した四糖ユニットとのグリコシル化反応に供することで、現在までに、九糖、十三糖のポリラクトサミン骨格の構築、精製を達成した。今後は、四糖ユニットの等量を増やす等、グリコシル化反応の条件検討を行いさらなる長鎖のポリラクトサミン骨格の構築を目指す。




ポリラクトサミンの構造

Glycosylation, Polylactosamine, Polysaccharide

講演番号：2C13a01
講演日時：3 月 18 日 09:20～ C 校舎 13 会場

# 昆虫による食害でリンゴ果実に誘導される化合物群の分析と同定

# Analysis and identification of compounds induced in apple fruit by insect damage

○鐵本 夕貴[1]、吉永 直子[1]、石栗 陽一[2]、森 直樹[1] ([1]京大農、[2]青森産技セ　りんご研)
○Yuuki TETSUMOTO[1], Naoko YOSHINAGA[1], Youichi ISHIGURI[2], Naoki MORI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Aomori Prefectural Industrial Technology Research Center)

[目的]

モモシンクイガ *Carposina sasakii* はリンゴをはじめとするバラ科果樹の重要害虫である. 雌成虫は果実表面に卵を産み付け, 孵化した幼虫は果実内部へ食入し, 果肉を食べて成長する. 十分に成長した幼虫は果実外部へ脱出し, 蛹化を経て成虫になる. 近年, 樹に着いたままの着果果実において, 果実内部に食入したモモシンクイガの幼虫が高い確率で死亡することが報告された [1]. 本研究では, モモシンクイガ幼虫の果実内部における死亡の原因を化学的側面から解明することを目的とした.

先の本大会で, モモシンクイガ幼虫がリンゴ果実内に食入した際に誘導される化合物 6 種類に着目し, そのうち 2 種類がトリテルペン 2α,19α-dihydroxy-3-oxo-12-ursen-28-oic acid および ursolic acid であることを報告した [2]. 本発表では, 食害によって誘導される化合物群の誘導量の経時変化を確認し, 着果果実で特に多く誘導される化合物 2 種を新たに同定した.

[結果・考察]

モモシンクイガ幼虫がリンゴ果実内に侵入した食入口及び果実内部の虫害痕付近からリンゴ果実をくり抜いてメタノールで抽出し, LC/MS で分析した. その結果, 食害によって誘導が確認される 6 化合物すべてにおいて, 食入口および虫害痕における誘導量が食入後の時間経過に従って劇的に増減した.

また, 先の発表で未同定だった 4 化合物 A (*m/z* 339), B (*m/z* 355), C (*m/z* 409), D (*m/z* 520) のうち, 着果果実で特に多く誘導され, 食害部周辺の広い範囲に分布する未知化合物 B (*m/z* 355) およびその類縁体と思われる化合物 A の精製を試みた. 精製後の NMR 分析および LC/MS 分析の結果から, 化合物 A, B をカフェー酸類縁体の一種であると同定した. 今回同定した化合物とモモシンクイガ幼虫の果実内部における死亡との関連について考察する.

1) Ishiguri, Y., Toyoshima, S. Appl. Entomol. Zool., 41, 685-690, 2006
2) 森田ら, 2016 年度日本農芸化学会大会要旨集, 2016

apple fruit, insect damage, induction

発表責任者：鐵本 夕貴（tetsumoto.yuuki.57a@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2C13a02
講演日時：3 月 18 日 09:35～ C 校舎 13 会場

モモシンクイガ雌成虫触角に対する炭酸カルシウム水和剤の化学的効果
Activity of calcium carbonate hydrating agent to Carposina sasakii female moth antennae
○風間 春奈[1]、手嶋 伸[1]、田中 真史[1]、吉永 直子[1]、高梨 琢磨[2]、所 雅彦[2]、石栗 陽一[3]、森 直樹[1] ([1]京大農、[2]森林総研、[3]青森産技セ　りんご研)
○ Haruna KAZAMA[1], Shin TEJIMA[1], Masashi TANAKA[1], Naoko YOSHINAGA[1], Takuma TAKANASHI[2], Masahiko TOKORO[2], Yoichi ISHIGURI[3], Naoki MORI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Forestry and Forest Products Research Institute, [3]Aomori Prefectural Industrial Technology Research Center)

モモシンクイガ *Carposina sasakii* は，幼虫がリンゴ果実の中に食入して被害をもたらす，リンゴ栽培においてもっとも重要な害虫のひとつである．これまで殺虫剤散布による防除が主に行われてきたが，近年では農薬の使用を減らした栽培体系が模索され始めている．殺虫剤使用量を削減する目的で交信かく乱法などが用いられるようになってきたが，効果は不十分であり，それを補う新たな防除法の確立が望まれる(1)．

殺虫剤に依存しない防除法を模索する中で，石灰を含む薬液に被害抑制効果があることが見いだされ(2)，炭酸カルシウム水和剤ホワイトコート（白石カルシウム株式会社）を散布した果実では産卵数が有意に減少することが示された(3)．その要因として，果実表面と虫体感覚器に対する物理的影響と，果実から生じる揮発性化学物質の変化の 2 つの可能性が考えられる．後者の化学的要因の可能性について GC-EAD（触角電位検出器付きガスクロマトグラフィー）を用いて検証した．

モモシンクイガの既交尾雌成虫の触角を用いた GC-EAD において，リンゴ幼果由来の揮発成分を供試すると，nonanal，decanal に対して特に強い触角電位応答が見られた．一方，炭酸カルシウム水和剤を噴霧したリンゴ幼果から捕集した揮発性成分を供試したところ，処理幼果に特異的な 2 種の未知成分に対して触角電位応答が観察された．これら 2 成分は，炭酸カルシウム水和剤のジクロロメタン抽出物からも検出されたことから，シリカゲルカラムで精製し構造を決定した．当該化合物が炭酸カルシウム水和剤の産卵抑制メカニズムにどのように寄与しているかを検証するため，モモシンクイガ雌成虫を用いた生物試験を行った．

1）荒川昭弘・岡崎一博（2002）植物防疫 56:97-101.
2）伊藤正輔（1952a）石灰液散布によるモモシンクイガの産卵防止．農業及び園芸 27:931-932.
3）石栗陽一・吉永直子（2015）モモシンクイガのリンゴ果実への産卵に及ぼす炭酸カルシウム水和剤の影響．北日本病虫研報 66:144-147.

*Carposine sasakii*, apple, GC-EAD

講演番号：2C13a03
講演日時：3 月 18 日 09:50～ C 校舎 13 会場

ダイズさび病菌に対する抵抗性ダイズ品種の化学的応答
Chemical reaction of a resistant variety of soybean to the infection of *Phacopsora pachyrhizi*

○中田 隆[1]、竪石 秀明[2]、永塚 隆由[2]、吉永 直子[1]、小野 肇[1]、Eric Schmelz[3]、寺石 政義[4]、奥本 裕[4]、森 直樹[1] ([1]京大院農・応用生命、[2]株式会社クレハ農薬研究所、[3]カリフォルニア大学サンディエゴ校、[4]京大院農・農)

○Ryu NAKATA[1], Hideaki TATEISHI[2], Takayoshi EIZUKA[2], Naoko YOSHINAGA[1], Hajime ONO[1], Eric SCHMELZ[3], Masayoshi TERAISHI[4], Yutaka OKUMOTO[4], Naoki MORI[1] ([1]Kyoto Univ., Department of Applied Life Sciences, [2]Kureha Co., Agrochemical Research Laboratories, [3]UCSD, [4]Kyoto Univ., Division of Agronomy and Horticultural Science)

[背景・目的]

ダイズさび病菌 (*Phakopsora pachyrhizi*) はダイズ (*Glycine max*) の主要な病原菌の一種である．さび病菌に対して抵抗性を示すダイズ品種が知られており，それらの抵抗性遺伝子の研究が進んでいる．しかし，抵抗性に直接寄与する物質やその作用メカニズムなどの物質的基盤は不明である．

本研究では，さび病菌抵抗性のダイズ品種に含まれる二次代謝物を明らかにし，抵抗性への寄与を調べることを目的とした．特に，さび病菌に感染したダイズで誘導される二次代謝物に着目した．

[方法・結果]

① 抵抗性の評価

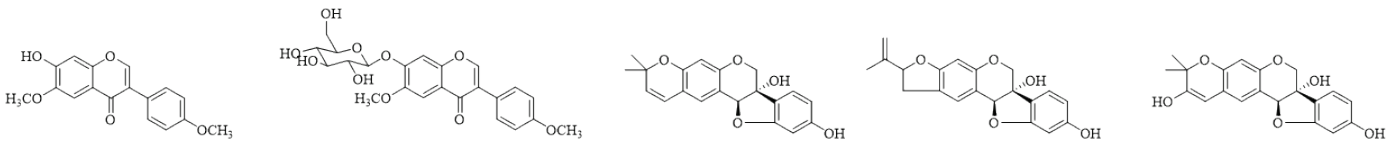
ダイズ 4 品種 (ホウギョク・エンレイ・フクユタカ・タマホマレ) にさび病菌を接種し，胞子形成指数 [1)] で抵抗性を評価した．その結果，ホウギョクが強い抵抗性を示した．

② 抵抗性に寄与する誘導性二次代謝物の探索

上述 4 品種にさび病菌を接種し，感染葉を抽出して LC/MS で分析した．分析結果は主成分分析で解析し, ホウギョクで特徴的に誘導される二次代謝物を探索した. その結果, ポジティブイオンモードで *m/z* 299, 461, 321 (2 種), 337 の計 5 種の物質が見つかった．

③ 誘導性二次代謝物の同定

上述の 5 種の物質をさび病菌に感染したホウギョクから単離・精製した．ホウギョク葉を 80% MeOH で抽出し，ODS で分画後，HPLC で単離した．各物質の構造は NMR, LC-IT-TOF-MS, CD で解析し，afrormosin (*m/z* 299), afrormosin 7-*O*-glucoside (*m/z* 461), glyceollin II (*m/z* 321), glyceollin III (*m/z* 321), 13-hydroxyglyceollin (*m/z* 337) (新規化合物) を同定した．構造は下に示した．



Afrormosin　Afrormosin 7-*O*-glucoside　Glyceollin II　Glyceollin III　13-Hydroxyglyceollin II

[参考文献] 1) ダイズさび病抵抗性に関する研究のための実験マニュアル
https://www.jircas.affrc.go.jp/english/manual/soybean_rust/JIRCAS_manual_soybean_rust_v22.pdf

*Glycine max*, *Phacopsora pachyrhizi*, Glyceollin

講演番号：2C13a04
講演日時：3 月 18 日 10:05～ C 校舎 13 会場

ウメの葯の蛍光とミツバチの訪花行動への影響
Effect of the fluorescence from anthers of Japanese apricot on the foraging activity of honeybees
○森 信之介[1]、川上 真理[1]、大石 雅典[1]、福井 宏至[2]、後藤 勝実[3]、月岡 淳子[3]、佐久間 正幸[1]、中西 テツ[4]、渡辺 正夫[5]、平井 伸博[1]（[1]京都大院農、[2]香川大名誉教授、[3]京都薬科大附属薬用植物園、[4]神戸大名誉教授、[5]東北大院生命）
○Shinnosuke MORI[1], Mari KAWAKAMI[1], Masanori OISHI[1], Hiroshi FUKUI[2], Katsumi GOTO[3], Junko TSUKIOKA[3], Masayuki SAKUMA[1], Tetsu NAKANISHI[4], Masao WATANABE[5], Nobuhiro HIRAI[1] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Prof. Emeritus of Kagawa Univ., [3]Garden of Med. Plants, Kyoto Pharm. Univ., [4]Prof. Emeritus of Kobe Univ., [5]Grad. Sch. Life Sci., Tohoku Univ.)

【目的】多くの植物の花粉および葯は紫外線下において青色蛍光を発する。これらの蛍光の化学生態学的機能には 2 つの仮説が考えられる。1 つ目は、蛍光物質が花粉表面で紫外線を吸収し蛍光に変換して放出することによって雄性遺伝子を保護している可能性、2 つ目は、植物が蛍光によって訪花昆虫を視覚的に誘引して受粉を効率化している可能性である。これらの仮説を検証するために、我々はこれまでに 6 種類の植物の花粉および葯を調べ、抗酸化活性を有する acteoside や chlorogenic acid 等のヒドロキシ桂皮酸類が青色蛍光物質として含まれていることを明らかにした。さらにセイヨウミツバチ（*Apis mellifera*）を用いた行動実験の結果、ミツバチが太陽光下で chlorogenic acid の蛍光を認識することと、その蛍光に誘引される可能性が高いことも判明した。これらの結果は上記の仮説を支持している。今回、仮説のさらなる検証のため、農業上重要な果樹であるウメに着目した。

ウメ（*Prunus mume*）は我が国において古くから栽培されてきた主要果樹であるが、問題点として収量の年次変動が大きいことが知られている。通常ウメの受粉にはセイヨウミツバチが用いられており、ミツバチの訪花が少ないと収量低下につながると考えられる。しかしウメの花の形質とミツバチの訪花活動の関係はほとんど調べられていない。本研究では、その関係を明らかにするために、まずウメの花の葯が発する蛍光の化学物質レベルでの解析を目的とした。

【結果と考察】ウメ（*P. mume* 'Nanko'）の花を紫外線下で観察したところ、どの花も花粉は蛍光を示さないこと、蛍光性の葯を持つ花と無蛍光性の葯を持つ花の 2 種類が存在していることが明らかとなった。顕微鏡観察によって、蛍光を発するのは葯の内壁であることが分かった。花弁と葯の形態から、無蛍光性葯をもつ花が若く、蛍光性葯をもつものは比較的老いた花であると推定された。葯を蛍光性と無蛍光性に選別し、それぞれの MeOH 抽出物を HPLC と TLC で分析した結果、両者ともに蛍光物質 3 種と黄色色素 1 種を含んでいることが分かった。抽出物を精製し、各種スペクトル解析によって、蛍光物質を 1-*O*-feruloyl-β-D-glucose とその *cis*−isomer および chlorogenic acid、黄色色素を quercetin 3-*O*-β-glucoside と同定した。無蛍光性葯には、蛍光性葯には含まれない紫外線吸収物質が 7 種類含まれており、それらは $N^1$,$N^5$,$N^{10}$-tri-*p*-coumaroylspermidine の異性体と同定した。無蛍光性葯では、これらの紫外線吸収物質が葯あるいは花粉の表層で紫外線を吸収することによって、葯の内壁に蛍光物質の励起光が届かず、蛍光物質が発光できなくなっていると考えられる。ミツバチはウメの花を訪問する際、蛍光の有無を利用して花の鮮度を識別し、花粉や花蜜の有効性を判断している可能性がある。

Prunus mume, Fluorescent compound, Honeybee

発表責任者：森 信之介（mori.shinnosuke.72x@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2C13a05
講演日時：3 月 18 日 10:20～ C 校舎 13 会場

# キク科植物が生産する新奇ストリゴラクトンの探索

# Investigation of novel strigolactones produced by Asteraceae

○松下 明真[1]、松田 一彦[2]、野村 崇人[1]、米山 弘一[1]、謝 肖男[1] ([1]宇都宮大学　農学部、[2]近畿大学農学部)
○Asuma MATSUSHITA[1], Kazuhiko MATSUDA[2], Takahito NOMURA[1], Koichi YONEYAMA[1], Xiaonan XIE[1] ([1]Utsunomiya University, [2]Kindai University)

【目的】植物が生産・分泌するストリゴラクトン（strigolactone, SL）は、植物の根から土壌根圏に放出されると、ストライガやオロバンキなどの世界の農業生産に甚大な被害をもたらしている根寄生雑草種子の発芽刺激物質として働く。また、アーバスキュラー菌根菌との共生を促す宿主認識シグナルとしても働いている。さらに、SL は植物地上部および地下部の形態形成を制御する植物ホルモンである。植物が生産する SL を明らかにすることは、植物の生理生態の解明や、根寄生雑草の防除法の確立などに重要である。SL の生合成経路および植物界における SL の分布をより明確にするため、本研究では、これまでに殆ど研究されていない、もっとも進化し、分化しているとされるキク科植物を中心に、SL の同定および新奇 SL の構造解析を行った。
【方法】実験に用いるキク科植物はセイタカアワダチソウおよび除虫菊とし、それぞれの種子を水耕栽培し、水耕液に含まれる根浸出物を活性炭に吸着させて回収した。活性炭をアセトンで溶出し、アセトンを減圧濃縮後、水性残渣を酢酸エチルで抽出し、脱水濃縮後、酢酸エチル可溶物を得た。得られた粗抽出物を RP-HPLC で分取し、各フラクションについてヤセウツボ（*Orobanche minor*）種子に対する発芽刺激活性を調査した。また、LC-MS/MS を用いて既知ストリゴラクトンの同定を行った。さらに、ヤセウツボ種子に対する発芽刺激活性を指標にして、NE 区をシリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび RP-HPLC で精製・単離した。単離したサンプルは、種々の機器分析によって構造解析を行った。
【結果】LC-MS/MS分析ではセイタカアワダチソウおよび除虫菊の根浸出物からABC環をもつ典型的SLが検出されなかったが、カーラクトン酸の存在が認められた。また粗抽出物をHPLCにより分画してヤセウツボ種子に対する発芽刺激活性が認められたフラクションを分析したところ、フラグメントイオンの解列パターンから、少なくとも２種類のカーラクトン誘導体と思われる新奇SLの存在が示唆された。現在、これら新奇SLをさらに精製し、NMRなどの機器分析によって構造解析を行っている。

plant hormone, strigolactone, *Araceae*

講演番号：2C13a06
講演日時：3 月 18 日 10:45～ C 校舎 13 会場

Chemical investigation of methyl jasmonate-inducible sesquiterpenes from immature seeds of wild *Daucus carota* distributed throughout Sapporo area

○Meijuan Lin, Motoi Yokota, Yasuyuki Hashidoko (Hokkaido University)

**Background**: Wild carrot (*Daucus carota*) is a biennial plant of family Apiaceae. Although it is known that essential oil from mature carrot seeds contains daucane-class sesquiterpenes (+)-carotol and (+)-daucol as its major chemical constituents, many studies have also revealed that chemical composition of the carrot oil showed a high local variation. Our preliminary study revealed that wild carrot seeds from Sapporo area, Hokkaido, rarely contained daucane-class sesquiterpene. We hence started investigating methyl jasmonate-inducible sesquiterpenes in immature seeds attaching peduncles treated with solution of 400 μM methyl jasmonate (MeJA). By means of structure elucidation of MeJA-inducible sesquiterpenes, we attempted to reveal the most active sesquiterpene biosynthetic pathway in the immature seeds of wild *D. carota* distributed throughout Sapporo area.
**Method, Results, and Discussion**: Green-colored immature seeds of wild *D. carota* were collected around the area of Kaminopporo Station in Sapporo, in September 2016. The immature seeds attached to peduncles (645 g fw) allowing to absorb 400 μM MeJA solution via the peduncle for 48 h at 25 °C in the dark were directly soaked in $Et_2O$ for extraction of the inducible sesquiterpenes. Extracts obtained and contained MeJA-inducible sesquiterpenes were fractionated by silica gel column chromatography (250 g $SiO_2$) to elute with hexane-EtOAc. By the column chromatography, 12 fractions were obtained, and the fractions eluted with hexane:EtOAc 4:1 and 7:3 mainly contained a mixture of sesquiterpenes (1.46 g and 1.55 g, respectively). As the fraction contained compounds showing parent ions ($M^+$) in FD-MS at *m/z* 320 and 322 and at *m/z* 218, 234, 320, 408, and 422, respectively. Among them, at least six of them were estimated to be sesquiterpene derivatives. These mixtures were subjected to alkaline hydrolysis and/or acetylation to yield relatively separable substances. By means of spectroscopic analyses (EI- and FD-MS, $^1$H- and $^{13}$C-NMR, and 2D-NMR), the major hydrolytic product in fraction 4 (hexane:EtOAc 4:1) was identified as *rel*-(1*S*,6*S*,7*S*,8*S*,10*S*)-cadinane-4-en-8,10-diol ($M^+$, *m/z* 238), and hence natural compound was assignable as *rel*-(1*S*,6*S*,7*S*,8*S*,10*S*)-8-hydroangeloylcadinane-4-en-10-ol, as novel compound inducibly produced by the wild carrot in Sapporo area. Sesquiterpene mixture in the latter fraction was also subjected to alkaline hydrolysis and the major hydrolytic product ($M^+$, *m/z* 254) was further subjected to acetylation. By means of spectroscopic analyses (FD-MS, $^1$H- and $^{13}$C-NMR, and 2D-NMR), the major acetylated product ($M^+$, *m/z* 338, diacetate) showed it as a germacrane-class sesquiterpene triol tiglate ester. As we also identified another germacrane-class sesquiterpene from immature carrot seeds that had been treated with MeJA in our previous study but no carotene class, wild carrot in Sapporo area probably lacks ability to produce carotene-class sesquiterpenes.

Methyl jasmonate-inducible sesquiterpene, Immature seeds of wild *Daucus carota*, Sapporo area

発表責任者：Yasuyuki Hashidoko（yasu-h@abs.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：2C13a07
講演日時：3 月 18 日 11:00～ C 校舎 13 会場

# イネ葉身に形成されるアモルファスシリカの形態による構造比較
# Structural comparison of silica bodies with different shapes in rice leaves

○小瀬 義樹[1]、尾崎 紀昭[2]、三輪 京子[1]、川野 潤[3]([1]北大・院環境、[2]秋田県大・生物資源、[3]北大・院理)
○Yoshiki KOSE[1], Noriaki OZAKI[2], Kyoko MIWA[1], Jun KAWANO[3] ([1]Grad. Sch. Env. Hokkaido Univ., [2]Akita Pref. Univ., [3]Fac. Sci. Hokkaido Univ.)

【背景・目的】
生物には環境中のケイ酸を集積する種が存在する。ケイソウやカイメンは多様なシリカ骨格を形成し、植物においてはイネがケイ酸集積植物として知られている。イネは高濃度にケイ酸を蓄積し、生物的・非生物的ストレスに対する耐性を獲得している。ケイ酸は根からケイ酸輸送体により吸収され、葉身や籾殻で重合することでアモルファスシリカ($SiO_2 \cdot nH_2O$)として体内に集積する。シリカは葉身の表面を被覆し、葉の物理的強度を高めることで、イネの倒伏耐性や光合成効率を向上させる。また、機動細胞内に集積したシリカは細胞内に病原菌の侵入を防ぐ役割も持つ。これまで、イネの組織や細胞により特有の形態を示すシリカの存在が記述されたが、形態ごとの解析は行われてこなかった。本研究では葉身表面のプリックルヘアーに由来するポイント型(毛状)シリカと、機動細胞内に集積するファン型(扇形)シリカを対象として、単離した各シリカを個別に解析し、形態における化学的な構造の違いを明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】
圃場で栽培されたイネ葉身を用い、時計皿法によって単離した複数の形態を示すシリカの内、扇形シリカと毛状シリカを解析対象とした。各形態のシリカを用いて顕微フーリエ変換赤外分光法(FT-IR)による測定を行い、赤外吸収スペクトルを得た。両者のスペクトルにはともに Si-O の結合・$H_2O$ または OH 基を示すピークが確認されたが、形態により OH 基の結合様式が異なることがわかった。また、スペクトル分析により、アモルファスシリカの構造内の Si-O 6 員環の割合は、扇形シリカが毛状シリカより低いことが示された。顕微ラマン散乱分光法による解析において、Si-O 4 員環を示すピークが、扇型シリカに現れたが、毛状シリカには検出されなかったことからも上記の結果が支持された。
通常、結晶質の $SiO_2$ は、Si-O 6 員環で構成される。そのため、扇形シリカは毛状シリカに比べ、重合度が低く不安定な構造を持つことが示唆された。このように、形態によってアモルファスが化学的な構造の違いを持つことは、イネの組織や細胞によりケイ酸の集積過程が異なり、珪化細胞に含まれる生体高分子の種類や、シリカのイネの中での機能を反映している可能性が考えられる。

biomineralization, rice, silica

講演番号：2C13a08
講演日時：3 月 18 日 11:15～ C 校舎 13 会場

イネ葉身のケイ酸体に含まれる有機物の同定
Identification of organic matrix in silica bodies from rice leaves
○石田 拓也[1]、鈴木 道生[2]、常盤野 哲生[1]、吉澤 結子[1]、尾崎 紀昭[1]([1]秋田県大生資科、[2]東大院農生科)
○Takuya Ishida[1], Michio Suzuki[2], Tetuo Tokiwano[1], Yuko Yoshizawa[1], Noriaki Ozaki[1] ([1]Akita Pref. Univ., [2]The Univ. of Tokyo)

【背景と目的】
イネはケイ酸輸送体を用いて根からケイ酸を吸収し、籾殻や葉身にケイ酸体（シリカが主成分）を形成する。珪藻や海綿においては、シリカ内に含まれる有機物がケイ酸重合を促進し、常温・常圧下でシリカを形成する。しかし、イネにおけるシリカ形成の分子機構は未解明のままである。
我々はこれまでに、イネ葉身からケイ酸体を単離する方法（時計皿法）を確立した。さらに、酸・酵素処理によって単離ケイ酸体からシリカを精製することに成功し、シリカに 11 kDa の基質タンパク質が含まれることを報告した(日本農芸化学会 2015 年度大会)。本研究の目的は、この基質タンパク質を同定し、局在および機能を解析することである。

【方法】
・シリカの精製-ケイ酸体の細胞壁の除去とシリカ表面の洗浄-
時計皿法で単離したケイ酸体に対し、濃硫酸処理（80%硫酸、50℃、1 時間)、希硫酸処理（30%硫酸、50℃、1 時間）による 2 段階の加水分解を行なった後、10%セルラーゼ（オノズカ RS）溶液を添加することで、ケイ酸体の周囲を覆う細胞壁を分解した。細胞壁を除去したシリカ表面を SDS-EDTA、SDS-PAGE 用試料緩衝液で洗浄し、精製シリカとした。
・基質タンパク質の抽出と同定
8 M フッ化水素（HF）溶液を添加し、精製シリカを溶解した。この溶解液を透析・濃縮したものを HF 可溶性画分とし、SDS-PAGE に供した結果、11 kDa のバンドが確認された。このバンドを切り出し、ゲル内消化法により調製したペプチド断片試料の MS 解析を行った。

【結果および考察】
MS 解析の結果、SDS-PAGE で検出した 11 kDa のバンドの主成分を LTPL12 と同定した。LTPL12 は Lipid Tranfer Protein（LTP）ファミリーに属する。 LTP は植物に普遍的に存在する多機能な防御タンパク質と考えられている。LTP ファミリーに属する LTPL12 がシリカ内部に存在するという報告は本発表が初めてである。今後、LTPL12 の局在とシリカ形成に対する機能を明らかにする予定である。

biomineralization, rice, silica

発表責任者：尾崎紀昭（ozanor@akita-pu.ac.jp）

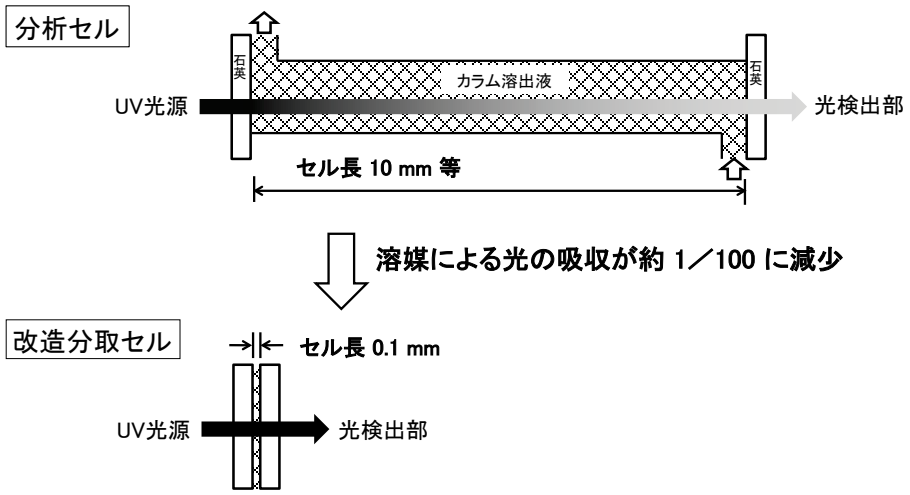
講演番号：2C13a09
講演日時：3 月 18 日 11:30～ C 校舎 13 会場

# 改造分取セルを用いた HPLC 定量分析法の開発

# Development of quantitative HPLC analysis using original uv-cell

○松本 恵実、石野 暢好、藤野 和孝、牧岡 富広、中塚 進一（長良サイエンス（株））
○Emi MATSUMOTO, Nobuyoshi ISHINO, Kazutaka FUJINO, Tomihiro MAKIOKA, Shin-ichi NAKATSUKA (Nagara Science Co., Ltd.)

HPLC で定量分析する際、化合物の検出には UV 検出器を用いることが多い。しかしながら脂質や糖質等、特徴的な共役系の UV 吸収を持たない化合物も多く、RI や ELSD 等の他の検出器が用いられているが、装置が高価で操作技術の習熟が必要である。そこで我々は汎用性の高い UV 検出器を用いる方法を検討してきた。特徴的な UV 吸収を持たない化合物でも、単独の C=C, C=O 等の二重結合やカルボキシル基、水酸基等が存在すれば、200nm 付近の UV エンド吸収領域の紫外線はかなり強く吸収される。UV 検出器の分析セルは厚みが 10mm 等で微量な化合物も検出できるが、UV エンド吸収領域では溶媒自身や共存する不純物の光の吸収に影響を受ける。一方、分取セルは厚みを薄くして感度を下げている。我々は分取セルの厚みを 0.05mm にし、さらに構造を分析用に改造することで、ハロゲン系溶媒でも UV エンド吸収で定量分析できる方法を確立し報告してきた [1, 2]。しかし、セル長 0.05mm のセルは特注品で市販されていないため、本法の普及は困難であると考えて改良法を検討した。市販のセル長 0.1mm の分取セルを用いて UV エンド吸収による分析を試み、本法の汎用性を高めることを検討したので報告する。これまで使用できなかったハロゲン系溶媒を用いる順相系の定量分析が可能となったのでその実例について述べる。




UV 検出器におけるセル長と光透過（フローセル模式図）

1) 松本恵実, 中塚進一, FOOD Style 21, 17(3), 87-89 (2013), 食品化学新聞社。 2) 松本恵実, 中塚進一ら, 日本農芸化学会 2016 年度大会。

HPLC, quantitative analysis

発表責任者：中塚　進一（nagara@nsgifu.jp）

講演番号：2C13p01
講演日時：3 月 18 日 14:00～ C 校舎 13 会場

# Caco-2 細胞をモデルとした消化管 α-グルコシダーゼ量の測定と発現抑制素材の探索

Measurement of α-glucosidase amount using Caco-2 cell as an intestinal cell model and search for the suppressing resources

○野田 耕太[1]、加藤 英介[2]、川端 潤[2] ([1] 北大農、[2] 北大院農)
○ Kota NODA[1], Eisuke KATO[2], Jun KAWABATA[2] ([1]Hokkaido Univ., [2]Graduate school of Agriculture, Hokkaido Univ.)

［背景］

糖尿病は慢性疾患であり、インスリン生産能の低下やインスリン抵抗性により引き起こされる。消化管α-グルコシダーゼは糖の消化吸収過程にかかわる酵素であり、その阻害剤は食事後の急激な血糖値上昇を抑えることができるため、糖尿病の治療や予防に利用されている。一方で、α-グルコシダーゼの量を減少させた場合にも、同様に糖尿病の予防や治療効果が期待できると考えられる。そこで本研究では消化管α-グルコシダーゼの量に着目し、その発現を抑制する天然素材を探索することを目的とした。

［方法と結果］

ヒト小腸上皮細胞モデルとして利用される株化細胞に Caco-2 細胞があり、15-20 日間培養することで小腸上皮細胞様の形態へと分化してα-グルコシダーゼを発現することが報告されている。そこで消化管α-グルコシダーゼ量の測定モデルとして Caco-2 細胞を用いることとした。また基質の分解速度は酵素量に依存するため、酵素活性を指標として Caco-2 細胞が発現するα-グルコシダーゼ量を簡易に測定することとした。

分化した Caco-2 細胞に蛍光基質を添加したところ、時間と共に基質が分解して蛍光基が遊離し、蛍光量の増加が確認された。そこで次に、各種天然素材の抽出物を用いたα-グルコシダーゼ発現抑制素材の探索を行った。分化させた Caco-2 細胞に抽出物を添加して 2 日間培養後、細胞を洗浄してから蛍光基質を用いてα-グルコシダーゼ反応速度を測定した。

植物素材サンプル 60 種に対してスクリーニングを行ったところ、アカジソ（*Perilla frutescens* var. *crispa*）とヘザーフラワー（*Calluna vulgaris*）の抽出物がα-グルコシダーゼ量を低下させた。アカジソとヘザーフラワー抽出物についてα-グルコシダーゼの遺伝子発現やタンパク量に影響を与えているかをリアルタイム PCR、ウェスタンブロッティングを用いて定量することとした。現在アカジソ抽出物がスクラーゼーイソマルターゼ複合体の mRNA の発現量を低下させることが確認されており、アカジソにはα-グルコシダーゼ発現を抑制する物質が含まれていることが示唆されている。

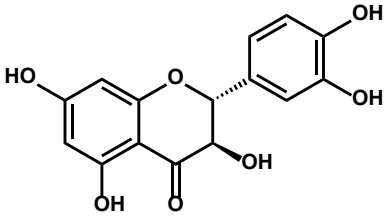
Diabetes mellitus, α-glucosidase, Caco-2 cells

発表責任者：加藤英介（eikato@chem.agr.hokudai.ac.jp）

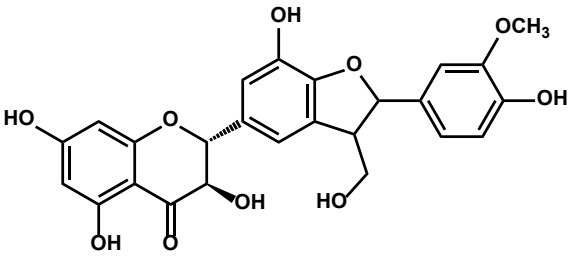
講演番号：2C13p02
講演日時：3 月 18 日 14:15～ C 校舎 13 会場

マリアアザミ（*Silybum marianum*）に含まれるα-アミラーゼ阻害物質の探索
Search for α-amylase inhibitors from *Silybum marianum*
○櫛引 夏花[1]、加藤 英介[1]、佐藤 浩志[2]、川端 潤[1]（[1]北大院農、[2]日生バイオ株式会社）
○Natsuka KUSHIBIKI[1], Eisuke KATO[1], Hiroshi SATOH[2], Jun KAWABATA[1] ([1]Graduate School of Agriculture, Hokkaido Univ., [2]Nissei Bio Co.)

**研究背景）**糖尿病は慢性的な高血糖状態を示す疾患であり、その患者数は世界中で増加し続けている。その治療法の一つに糖質消化酵素の阻害が挙げられ、α-アミラーゼ阻害剤やα-グルコシダーゼ阻害剤が利用されている。本研究では、α-アミラーゼ阻害物質を天然の植物素材から探索することを目的とした。
**方法・結果及び考察）**α-アミラーゼ阻害活性の評価には、化学修飾デンプンであるスターチアズーレを用い、酵素反応後に上清中に可溶化した青色色素量を測定し、コントロールと被験物質添加群の差から阻害率を算出した。
**結果及び考察）**各種植物抽出液のスクリーニングを行い、高い阻害活性を示したマリアアザミ（*Silybum marianum*、キク科）の含水エタノール抽出物からα-アミラーゼ阻害物質の探索を行った。マリアアザミエキス末の水懸濁液を酢酸エチル、1-ブタノールによって順次溶媒分配し、高い阻害活性を示した酢酸エチル可溶画分を各種カラムクロマトグラフィーにより分画した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分画の結果、taxifolin (**1**) と silychristin (**2**) を単離したが、これらの化合物には阻害活性は確認されず、残りの画分に阻害活性が確認された。この活性画分を逆相カラムクロマトグラフィーによる分画、続いて分取 HPLC に供した結果、silychristin の類縁体と推定される化合物を精製した。現在、この化合物の構造解析および阻害活性の評価を行っている。



taxifolin (**1**)



silychristin (**2**)

diabetes, α-amylase, silymarin

発表責任者：加藤英介（eikato@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：2C13p03
講演日時：3 月 18 日 14:30～ C 校舎 13 会場

ゴーヤ由来ククルビタン型トリテルペン類の GLP-1 分泌促進活性

*Momordica charantia* cucurbitane-type triterpenoids inducing GLP-1 secretion

○堀川 学[1]、東 鋭明[1]、鈴木 寿栄[2]、渡辺 斉志[2]、阿部 圭一[2]、島本 啓子[1]、加部 泰明[3]、入江 潤一郎[3] ([1]サントリー生命科学財団・生有研、[2]サントリーグローバルイノベーションセンター(株)、[3]慶応義塾大医)

○Manabu HORIKAWA[1], Toshiaki AZUMA[1], Toshihide SUZUKI[2], Hiroshi WATANABE[2], Keiichi ABE[2], Keiko SHIMAMOTO[1], Yasuaki KABE[3], Junichiro IRIE[3] ([1]Bioorganic Research Institute, Suntory Foundation for Life Sciences, [2]Suntory Global Innovation Center Ltd., [3]Keio Univ.)

【目的】健康野菜として古くから食されているゴーヤは、血糖値を下げる作用があると言われ、その活性成分は、ゴーヤ特有のククルビタン型トリテルペン類であるという報告が幾つかあるが、詳細な理解には至っていない。我々は、真の活性成分を明らかにするために、血糖値調節に寄与する GLP-1 分泌活性を指標に、ゴーヤの血糖値上昇抑制活性を示す成分の探索を行った。

【方法】ヒト小腸由来の培養細胞を用いたアッセイ系でゴーヤ抽出物および分画物等の GLP-1 分泌促進活性を指標に、ゴーヤ由来の血糖値調節に寄与する活性成分を明らかにする。

【結果】加熱処理したゴーヤのアセトン抽出物について分画精製を進め、脂溶性画分に GLP-1 分泌活性を認めたことから、本画分の精製を進めた。LC-MS 分析の詳細な解析の結果、本画分にはゴーヤ特有のククルビタン型トリテルペン類が多く含まれていることが判明したので、主要なトリテルペン類を単離精製し、GLP-1 分泌活性を確認したところ、主要な成分に GLP-1 分泌促進活性があることが明らかとなった。活性の高い主要なトリテルペンの混合物での GLP-1 分泌促進活性は、ゴーヤ抽出物全体の約 50%を示した。今回同定したトリテルペン類は、ほとんどがゴーヤから同定された既知化合物ではあるが、GLP-1 分泌活性については、報告されていない。今後、上記トリテルペン類の詳細な作用機構について検討する。

Momordic charantia, cucurbitane-type triterpenoids, GLP-1 secretion

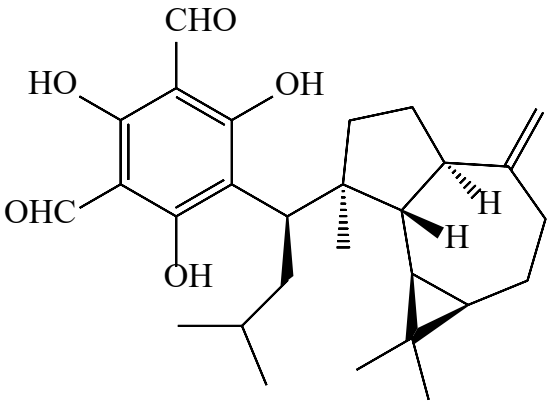
発表責任者：堀川学（horikawa@sunbor.or.jp）

講演番号：2C13p04
講演日時：3 月 18 日 14:45～ C 校舎 13 会場

ユーカリからのジペプチジルペプチダーゼ IV 阻害物質の探索
Search for dipeptidyl peptidase-IV inhibitors from *Eucalyptus globulus*
○川上 和宏[1]、加藤 英介[2]、川端 潤[2] ([1]北大農、[2]北大院農)
○Kazuhiro KAWAKAMI[1], Eisuke KATO[2], Jun KAWABATA[2] ([1]Hokkaido Univ., [2]Graduate school of Agriculture, Hokkaido Univ.)

糖尿病は血糖値調節ホルモンであるインスリンの作用不足により慢性的に高血糖を示す病気であり、年々患者数が増加しているため対策研究が盛んに行われている。インクレチンは食後腸上皮から分泌される消化管ホルモンで、インスリン分泌を促進して血糖値を低下させる作用がある。しかし、インクレチンは速やかにジペプチジルペプチダーゼ IV (DPP-IV) により不活化されてしまう。DPP-IV の阻害はインクレチンの不活化を防ぐため、糖尿病治療のターゲットとなっている。本研究では植物抽出物から DPP-IV 阻害物質を探索した。

DPP-IV 阻害活性は Gly-Pro-AMC を基質として、DPP-IV の働きにより遊離する AMC 量から算出した。植物 15 種の非タンニン画分についてスクリーニングを行ったところ、ユーカリ（*Eucalyptus globulus*）に DPP-IV 阻害活性があることが確認された。このため、ユーカリからの活性化合物の探索を行った。ユーカリのメタノール抽出物をクロロホルム:メタノール:水=4:1:5 で振盪分配後、クロロホルム層を 1%食塩水で洗浄することでタンニンを除いた低極性画分を得た。この画分を、順相クロマトグラフィーにより分画後、逆相 HPLC により精製して、活性物質として Macrocarpal C (**1**) と推定される化合物を単離した。しかし、文献値と $^1$H-NMR スペクトルが一部一致しないため、現在詳細な構造解析を行っている。




Macrocarpal C (**1**)

Diabetes, DPP-IV, *Eucalyptus globulus*

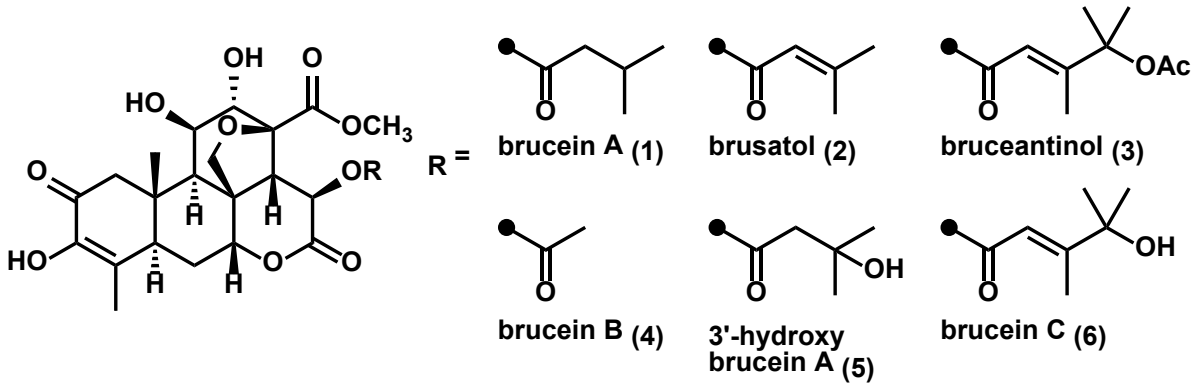
発表責任者：加藤　英介（eikato@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：2C13p05
講演日時：3 月 18 日 15:00～ C 校舎 13 会場

*Brucea javanica* 果実中のクアシノイド類は 3T3-L1 脂肪細胞の脂肪分解を促進する
Quassinoids from the fruit of *Brucea javanica* induce lipolysis in 3T3-L1 adipocytes
○加藤 英介、廣澤 亮太、ルーシー ラーリタ、川端 潤（北大院農）
○Eisuke KATO, Ryota Hirosawa, Lahrita Lucy, Jun Kawabata (Hokkaido Univ.)

［背景］
肥満症の患者数は世界中で増加傾向にあり、肥満の予防や改善を目的とした研究が幅広く行われている。抗肥満薬としては現在、食欲抑制剤や脂質の消化吸収を抑制するリパーゼ阻害剤が利用されているが、副作用などのリスクもあるため新たな薬剤も必要とされている。
肥満の解消効果が期待されているアプローチの一つに、脂肪組織で貯蔵されている脂質の分解を促進する脂肪分解促進活性があり、β3 アドレナリン受容体アゴニストなどを候補として抗肥満薬が開発されている。本研究では、インドネシア薬用植物の脂肪分解促進活性スクリーニングによって見出した *Brucea javanica* の抽出物より、脂肪分解促進活性物質の探索を行った。

［方法と結果］
分化させた 3T3-L1 脂肪細胞にサンプルを添加し、トリグリセリドの分解に伴い培養上清中に遊離するグリセロール量を定量することで脂肪分解促進活性を測定した。
*B. javanica* の果実粉砕物 200 g を 50%メタノール水溶液で抽出した。抽出物の脂肪分解促進活性を測定したところ、6.25 ng/mL 以上の濃度で活性を示した。次に抽出物を水と酢酸エチル、1-ブタノールで溶媒分配したところ、酢酸エチル可溶画分に活性が見られた。この画分をさらに各種カラムクロマトグラフィーにより分画することで、活性を示す化合物 1-6 を精製した。活性試験の結果、これらの化合物は 1 μM 弱の濃度で有意に脂肪分解促進活性を示した。




obesity, lipolysis, quassinoids

発表責任者：加藤　英介（eikato@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：2C13p06
講演日時：3 月 18 日 15:25～ C 校舎 13 会場

モロヘイヤの葉に含まれる抗酸化物質の探索
Search for Antioxidant from the Leaves of Mulukhiya (*Corchorus olitorius* L.)
○近田 賢治、河瀬 強志、勝崎 裕隆（三重大 生資）
○Kenji Konda, Tsuyoshi Kawase, Hirotaka Katsuzaki (Mie Univ.)

【背景・目的】
モロヘイヤ (*Corchorus olitorius* L.) はシナノキ科の一年生の草本であり、シマツナツとも呼ばれる。茎は繊維の原料として利用され、「ジュート」という名で知られている。種と実はストロファンチジンという強心配糖体を有しており、有毒であるため食用としては適さない。食用として口にするのは葉の部分であり、刻んだり茹でたりするとムチンによる粘りを呈する特徴があり、栄養価が非常に高いことから 「野菜の王様」 と言われている。
近年、食品の持つ機能の中で三次機能として知られている生体調節機能が重要視されている。その中の 1 つである抗酸化作用は、動脈硬化、ガンなどを誘発するコレステロールの酸化や、DNA 損傷をフリーラジカル除去によって抑制する機能で、この機能を有する食品中の天然抗酸化物質の研究が進んでいる。
本研究では、DPPH ラジカル消去活性試験をフリーラジカル消去能の指標として用いて、食用であるモロヘイヤの葉から抗酸化物質を探索することを目的とした。
【方法・結果】
三重県産の市販のモロヘイヤ 20 袋 (1,630 g) を 80%エタノールで 3 回抽出を行った。得られた抽出物を、XAD-2 を充填剤としたオープンカラムに供して、水:メタノール混合溶媒で段階的に溶出させて分画を行った。分画によって得られた画分について、DPPH ラジカル消去活性試験をおこなったところ、水溶出画分、60%メタノール溶出画分、メタノール溶出画分のすべてで活性を示した。その中で活性の高かった 60%メタノール溶出画分を逆相 HPLC で分取して活性成分の単離を行った。単離した成分のラジカル消去能を測定し、活性成分を特定した。得られた活性成分を MS、$^{1}$H-NMR、$^{13}$C-NMR、HSQC 解析を用いて構造解析した。その結果、MW.448 であるケンフェロール配糖体と、MW.551 であるケルセチン配糖体が推定され、MW.516 であるジカフェオイルキナ酸を同定した。また、それ以外に活性成分を含んでいることが判明した。

*Corchorus olitorius*, antioxidant, free radical

講演番号：2C13p07
講演日時：3 月 18 日 15:40～ C 校舎 13 会場

# 延命草（Isodon trichocarpus, 地上部）含有ジテルペノイド成分のメラニン産生抑制活性

# Diterpenoids from the Aerial Part of Isodon trichocapus with Melanogenesis Inhibitory Activity

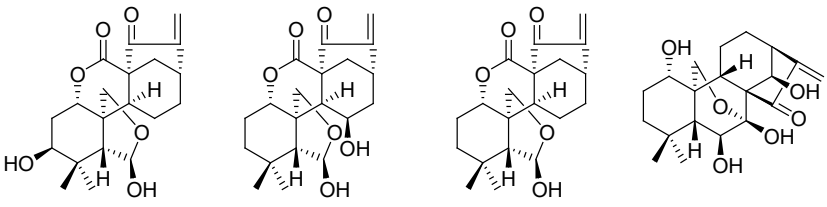
○加藤 和寛[1]、萬瀬 貴昭[1,2]、二宮 清文[1]、今川 貴仁[1]、松本 拓[1]、岡崎 茜[1]、岡田 枝里子[1,2]、要 欣志[2]、中村 翔[2]、森川 敏生[1]（[1]近畿大・薬総研、[2]株式会社 加美乃素本舗）
○Kazuhiro KATO[1], Yoshiaki MANSE[1,2], Kiyofumi NINOMIYA[1], Takahito IMAGAWA[1], Taku MATSUMOTO[1], Akane OKAZAKI[1], Okada ERIKO[1,2], Kinzi KANAME[2], Sho NAKAMURA[2], Toshio MORIKAWA[1] ([1]Pharm. Res. Technol. Inst., Kindai Univ., [2]Kaminomoto co.,LTD)

【目的】延命草は日本, 中国や韓国などに分布するシソ科 (Labiatae) 植物クロバナヒキオコシ (*Isodon trichocarpus*) およびヒキオコシ (*I. japonicas*) の地上部を基原とし，苦味健胃薬として胃酸過多，食欲不振，消化不良，腹痛の改善に用いられる．今回，その抽出エキスにマウス B16 melanoma 4A5 細胞におけるメラニン産生抑制作用を見いだしたことから，その活性寄与成分を明らかにする目的で含有成分の探索研究を実施した.

【方法・結果】 〈含有成分の分離〉四国産 (徳島・香川) *Isodon trichocarpus* 地上部を, MeOH にて還流抽出して MeOH 抽出エキス (生薬からの収率 9.9%) を得た．得られた MeOH 抽出エキスについて, theophylline により誘発されるメラニン産生への影響を検討した結果, 有意な低下が観察された ($IC_{50}$ = 6.6 μg/mL). そこで，活性を指標に活性寄与成分の探索を行った．すなわち MeOH 抽出エキスを水で懸濁した後, EtOAc にて溶媒分配を行い脂溶性分画である EtOAc 移行部と水層を得た．得られた水層を Diaion HP-20 カラムに付し，水溶出部および MeOH 溶出部を得た．得られた分画について順相および逆相カラムクロマトグラフィー, 次いで逆相 HPLC にて繰り返し分離精製し，主要成分である enmein (**1**), nodosin (**2**), isodocarpin (**3**) および oridonin (**4**) などを含む 10 種のジテルペノイド, 4 種のトリテルペノイド, 1 種のフラボノイドの計 15 種の化合物を単離・同定した.

〈メラニン産生抑制活性〉 24 穴培養プレートに B16 melanoma 4A5 細胞 (RCB0557) を播種し, 24 時間前培養後, 被験物質及び theophylline (終濃度 1 mM) を添加した. 72 時間培養後, 0.25% trypsin により細胞を剥離, 回収し, 1 M NaOH を加え, 80°C で 30 分加温した. 得られた細胞溶解液の O.D. をマイクロプレートリーダーにて測定した (405 nm). なお, 被験物質は DMSO に溶解し, 培地に添加した (DMSO 終濃度 0.1% (v/v)).

延命草より得られた成分について抽出エキスと同様にメラニン産生抑制活性を検討した結果, 主成分である **1** ($IC_{50}$ = 0.74 μM), **2** (1.8 μM), **3** (0.44 μM) および **4** (1.2 μM) に有意なメラニン産生抑制活性が認められた.これらは，陽性対照であるアルブチン (174 μM) よりも強い活性を示すことを明らかとした.




Isodon trichocarpus, enmein, melanogenesis inhibitor

発表責任者：森川 敏生（morikawa@kindai.ac.jp）

講演番号：2C13p08
講演日時：3 月 18 日 15:55～ C 校舎 13 会場

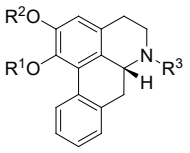
# 蓮花（*Nelumbo nucifera*，花部）含有メラニン産生抑制アルカロイド成分を指標とした品質評価
# Quantitative Determination of Alkaloids in Lotus Flower (Flower Buds of *Nelumbo nucifera*) and Their Melanogenesis Inhibitory Activity

○奥川 修平[1,2]、北川 仁一朗[1,2]、甕 千明[1,2]、田邉 元三[3]、亀井 惟頼[1]、二宮 清文[1]、吉川 雅之[1]、村岡 修[1,3]、森川 敏生[1]（[1]近畿大・薬総研、[2]小城製薬（株）、[3]近畿大・薬）
○ Shuhei OKUGAWA[1,2], Niiciro KITAGAWA[1,2], Chiaki MOTAI[1,2], Genzoh TANABE[3], Iyori KAMEI[1], Kiyofumi NINOMIYA[1], Masayuki YOSHIKAWA[1], Osamu MURAOKA[1,3], Toshio MORIKAWA[1] ([1]Pharm. Res. Technol. Inst., Kindai Univ., [2]Koshiro Co., Ltd., [3]Sch. Pharm., Kindai Univ.)

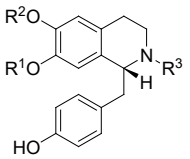
ハス (*Nelumbo nucifera*) はハス科 (Nelumbonaceae) ハス属の多年生の水生植物であり，アジアからオセアニアにおよぶ広範な地域に生育が認められ，日本にも自生していたとも考えられている．ハスは世界中で広く食用あるいは薬用に，様々な部位が利用されており，種子を蓮子，種皮を蓮衣，胚芽を蓮子芯，雄蕊を蓮髭，花托を蓮房，葉部を荷葉と称される．また，日本薬局方収載生薬でもある蓮肉は，強壮，止瀉，止渇，鎮嘔，健胃薬として用いるほか，啓脾湯，清心蓮子飲などの漢方処方に配合されている．花蕾部である蓮花は，中医学で血流を改善し，抗炎症作用や強壮作用が伝承されており，アーユルヴェーダ医学では腹部の疝痛や血性帯下の改善や強心剤としても利用されている．

今回，蓮花の MeOH 抽出エキスが B16 melanoma 4A5 細胞における theophylline 誘発メラニン産生を強く抑制することを明らかにし，含有成分について検討した結果，アポルフィン型およびベンジルイソキノリン型アルカロイド成分に強いメラニン産生抑制作用があることを明らかにした．一般に，アンモニア，第一級アミンおよび第二級アミンは，$CO_2$ を吸収し，カルバミン酸アンモニウム塩を生成することが知られており，第二級アミンである *N*-ノル型アルカロイド成分の安定性の評価を目的として，蓮花の主要な *N*-ノル型アルカロイド nornuciferine (**2**) についての安定性を評価したところ，空気雰囲気下 $CDCl_3$ 溶液中でカルバミン酸アンモニウム塩を形成することが明らかとなった．

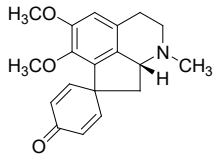
また，蓮花の品質評価および産地別の成分変動に関する知見を得る目的で，メラニン産生抑制作用の活性寄与成分についての科学的評価として，LC-MS を用いた 10 種類のアルカロイド (**1**–**10**) の定量分析を実施した．その結果，タイ産の検体にアルカロイドが多く含有しており，また，蓮花におけるアルカロイドの存在部位を検討したところ，主として花弁にアルカロイドが存在することが明らかになった．また，蓮花のメタノール抽出エキスのアルカロイド含量と，メラニン産生抑制作用の活性強度の相関について検討した結果，良好な相関 ($R$ = 0.9632) が得られたことから，蓮花の品質評価において，これら含有アルカロイド成分 (**1**—**10**) を定量分析することが有用であることを示す結果であると考える．



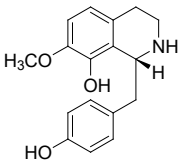

nuciferine (**1**, 7.1 μM)
: $R^1 = R^2 = R^3 = CH_3$
nornuciferine (**2**, 2.7 μM)
: $R^1 = R^2 = CH_3$, $R^3 = H$
*N*-methylasimilobine (**3**)
: $R^1 = R^3 = CH_3$, $R^2 = H$
asimilobine (**4**, 1.6 μM)
: $R^1 = CH_3$, $R^2 = R^3 = H$




armepavine (**5**, 6.5 μM)
: $R^1 = R^2 = R^3 = CH_3$
norarmepavine (**6**, 7.5 μM)
: $R^1 = R^2 = CH_3$, $R^3 = H$
*N*-methylcoclaurine (**7**)
: $R^1 = H$, $R^2 = R^3 = CH_3$
coclaurine (**8**, 3.9 μM)
: $R^1 = R^3 = H$, $R^2 = CH_3$




pronuciferine (**9**)




norjuziphine (**10**)

*Nelumbo nucifera*, quantitative analysis, melanogenesis inhibitor

発表責任者：森川敏生（morikawa@kindai.ac.jp）

講演番号：2C13p09
講演日時：3 月 18 日 16:10～ C 校舎 13 会場

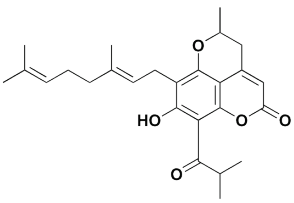
タイ天然薬物 *Mammea siamensis* 花部のアロマターゼ阻害活性
Aromatase Inhibitory Activity of Coumarins from the Flowers of *Mammea siamensis*

○柴谷 華苗[1]、二宮 清文[1]、田邉 元三[2]、筒井 望[2]、チャイペック サワニ[1,3]、ポンピリヤダチャ ユタナ[3]、村岡 修[1,2]、森川 敏生[1] ([1]近畿大・薬総研、[2]近畿大・薬、[3]ラジャマンガラ工科大)
○Kanae SHIBATANI[1], Kiyofumi NINOMIYA[1], Genzoh TANABE[2], Nozomi TSUTSUI[2], Saowanee CHAIPECH[1,3], Yutana PONGPIRIYADACHA[3], Osamu MURAOKA[1,2], Toshio MORIKAWA[1] ([1]Pharm. Res. Technol. Inst., Kindai Univ., [2]Kindai Univ., [3]Rajamangala Univ.)

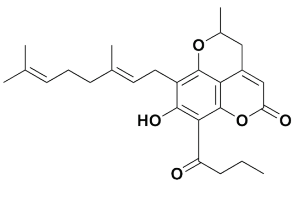
【目的】乳癌は発生初期において，女性ホルモンであるエストロゲンにより発生・増殖が促進されることから，エストロゲン依存性腫瘍のひとつとして知られている．一般に閉経後乳癌の 60～70% はエストロゲン依存性を示しているとされ，エストロゲンの受容体への結合を阻害する，もしくは，その供給を抑制するホルモン療法が，この乳癌に対する治療法として広く認識されている．閉経後乳癌のホルモン療法における標的酵素であるアロマターゼは，エストロゲン生合成の最終段階を担う律速酵素である．閉経後の女性においてエストロゲンの卵巣からの分泌は極端に減少し，副腎などから分泌されたアンドロゲンが筋肉，脂肪などの末梢組織のアロマターゼによって変換されることにより供給される．そのため，エストロゲン受容体陽性の閉経後乳癌治療において，上述のエストロゲン供給を抑制するアロマターゼ阻害剤が用いられている．我々は，新たな乳癌治療薬シーズの探索研究として，種々の天然資源由来抽出エキスのアロマターゼ阻害活性を検討したところ，タイ天然薬物であるテリハボク科 (Calophyllaceae) 植物 *Mammea siamensis* 花部の MeOH 抽出エキスに強い活性 ($IC_{50}$ = 16.5 μg/mL) が認められたことから，その活性寄与成分の探索研究を行ったので報告する．

【方法・結果】基質として dibenzylfluorescein を使用し，補酵素として NADPH を加えてアロマターゼ阻害活性試験を実施した．37ºC で 30 分間反応させた後，NaOH 水溶液を加え加温し，生成した蛍光物質の蛍光強度 (Ex 485 nm, Em 535 nm) を測定し，阻害率を算出した．*M. siamensis* 花部の MeOH 抽出エキスから調製した脂溶性分画および配糖体分画にアロマターゼ阻害活性が集約したことから，得られた成分のアロマターゼ阻害活性を検討した．その結果，mammeasin C (2.7 μM), mammeasin D (3.6 μM) および mammea B/AB cyclo D (3.1 μM) などを主活性成分として明らかにした．また，クマリン骨格の 4，6 あるいは 8 位にアルキル側鎖を持たない umbelliferone や scopoletin などでは活性が認められなかったことから ($IC_{50}$ >100 μM)，これらの側鎖部の存在が活性発現に関与していることが明らかとなった.[1, 2)]

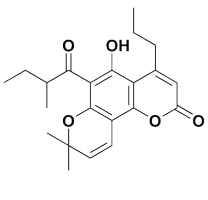
1) Morikawa, T., *et al*., *Bioorg. Med. Chem.*, **20**, 4968–4977 (2012).
2) Ninomiya, K., *et al*., *Chem. Pharm. Bull.*, **64**, 880–885 (2016).



mammeasin C



mammeasin D



mammea B/AB cyclo D

*Mammea siamensis*, mammeasin, aromatase inhibitor

発表責任者：森川敏生（morikawa@kindai.ac.jp）

講演番号：2C13p10
講演日時：3 月 18 日 16:25～ C 校舎 13 会場

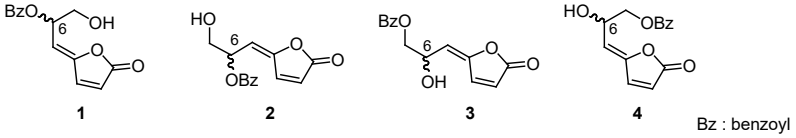
# タイ天然薬物 *Melodorum fruticosum* 由来成分の NO 産生抑制活性および含有 butenolide 類の全合成

# Total Synthesis of Butenolides from the Flower Buds of *Melodorum fruticosum* with Nitric Oxide Production Inhibitory activity.

○安藤 恵里[1]、萬瀬 貴昭[1]、田邉 元三[2]、福田 梨沙[2]、福田 友紀[2]、筒井 望[2]、三宅 史織[3]、中屋 友紀子[3]、山添 晶子[3]、松本 朋子[3]、松田 久司[3]、二宮 清文[1]、村岡 修[1,2]、森川 敏生[1]（[1]近畿大・薬総研、[2]近畿大・薬、[3]京都薬大）

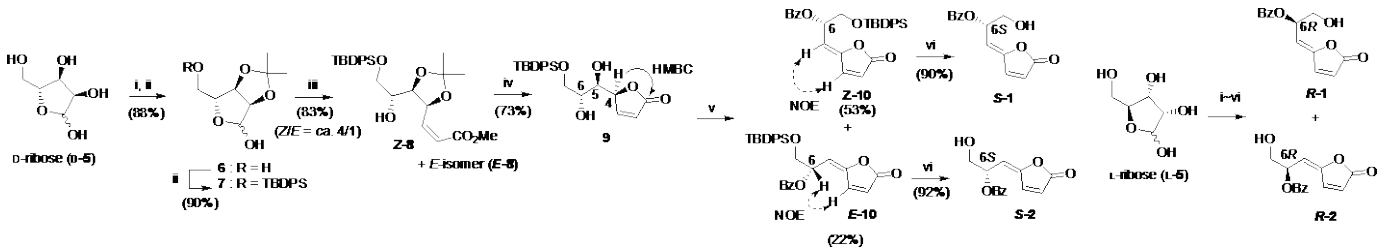
○Eri ANDOU[1], Yoshiaki MANSE[1], Genzoh TANABE[2], Risa FUKUDA[2], Yuki FUKUDA[2], Nozomi TSUTSUI[2], Shiori MIYAKE[3], Yukiko NAKAYA[3], Akiko YAMAZOE[3], Tomoko MATSUMOTO[3], Hisashi MATSUDA[3], Kiyofumi NINOMIYA[1], Osamu MURAOKA[1,2], Toshio MORIKAWA[1]
([1]Pharm. Res. Technol. Inst., Kindai Univ., [2]Sch. Pharm., Kindai Univ., [3]Kyoto Pharm. Univ.)

【目的】バンレイシ科 (Annonaceae) 植物 *Melodorum fruticosum* は, タイの北部および北東部に広く自生する灌木で, タイでは Lamduan と称され, シーサケート県の県木・県花に指定されている. その花部は古くから失神や目眩の改善に利用されているほか, アロマテラピーにも用いられている. これまでに我々は, *M. fruticosum* 花部の MeOH 抽出エキスに, マクロファージ様細胞 (RAW264.7) におけるリポ多糖刺激による NO 産生抑制活性を見いだし, 活性を指標に活性寄与成分の探索を実施した. その結果, 活性寄与成分として 3 種の新規 butenolide (**1**–**3**) および melodorinol (**4**) が, 強力な NO 産生抑制活性 (1.3–3.8 □M) を示すことを明らかにしている. その強度は, 陽性対照として用いた NF-□B 阻害剤, CAPE (3.8 □M) と同程度以上であった. しかし, melodorinol (**4**) を含め新規 butenolide **1**–**3** の 6 位不斉炭素の立体化学は明らかになっていない. そこで, これらの絶対立体構造の解明および両対掌体の活性評価を目的として, **1**–**3** の両エナンチオマーの合成に着手した.




【実験・結果】Butenolide 類 (**1**) の合成

*D*-ribose から 2 工程で合成した 4 を Wittig 反応により *Z*-5 に導いた後, 酢 酸存在下でラクトン化を行い 6 に導いた. 引き続き, 6 を塩基性で $Bz_2O$ と処理し, *Z*-7, *E*-7 とした後, TBAF で脱シリル化に付し, 6*S*-1, 6*S*-2 を得た. また, これらの対掌体 6*R*-1, 6*R*-2 を *L*-ribose から合成した. キラルカラムを用いた HPLC 分析による標品との比較を行い, 天然物 1, 2 の 6 位の立体化学がいずれも *S* および *R* 配置の混合物であることを明らかにした.




**Scheme 1**. *Reagents and conditions*: i) acetone, $cH_2SO_4$, rt; ii) TBDPSCl, imidazole, DMF, 0°C; iii) $Ph_3P{=}CHCO_2CH_3$,$CH_2Cl_2$, reflux; iv) AcOH-$H_2O$, 70°C; v) $Bz_2O$, $Et_3N$, DMAP, $CH_2Cl_2$, rt; vi) TBAF, AcOH, THF, 0°C-rt.

*Melodorum fruticosum*, Nitric Oxide Production Inhibitory, Butenolide

発表責任者：森川敏生（morikawa@kindai.ac.jp）

講演番号：2C13p11
講演日時：3 月 18 日 16:50～ C 校舎 13 会場

ハマアザミ（*Cirsium maritimum* Makino）の抗アレルギー活性とその活性物質
Anti-allergic activity of *Cirsium maritimum* Makino and its active substance
○鈴木 大進[1]、田中 守[2]、岡本 威明[3]、渡邊 浩幸[2]（[1]高知県工業技術センター、[2]高知県立大学、[3]愛媛大学）
○ Masanobu SUZUKI[1], Mamoru TANAKA[2], Takeaki OKAMOTO[3], Hiroyuki WATANABE[2]
([1]Kochi Prefectural Industrial Technology Center, [2]University of Kochi, [3]Ehime University)

【背景と目的】
ハマアザミ（Cirsium maritimum Makino）は、植物温帯の海岸に生育するキク科アザミ属の多年草である。ハマアザミは、日本では千葉県以南以西から九州まで分布しており、高知県では伝統的に、根や葉を天ぷら等にして食する食用植物であることが知られている。これまでの研究から、ハマアザミ抽出物に抗酸化作用や抗菌作用があることが報告されているが、他の機能性についてはほとんど報告されていない。
工業技術センターでは、県内に自生する未利用植物について健康食品・化粧品としての素材探索を行い、生活習慣病予防効果を中心とした種々の機能性を評価してきた。抗アレルギー活性についてスクリーニングを行った結果、ハマアザミに強い活性を見出したため、その活性成分の同定と抗アレルギー活性のメカニズム解明を目指した。
【方法】
抗 DNP-HSA 抗体で感作させたラット好塩基球様細胞株 RBL-2H3 細胞からの NDP-HSA 抗原刺激により惹起される脱顆粒現象をβ-hexosaminidase 放出活性により評価し、*in vitro* での抗アレルギー活性の指標とした。ハマアザミの葉及び茎を酢酸エチルを用いて抽出し、抗アレルギー活性を指標として各種クロマトグラフィー、HPLC により分画し、活性成分を単離した。活性成分の同定は、$^{1}$H-NMR 及び $^{13}$C-NMR を用いて行った。*in vivo* での抗アレルギー活性は、C3H/HeJ マウスに 1%ハマアザミ抽出物を含む標準飼料を 4 週間食餌させ、抗原感作を行った後、血清中及び糞中の各種抗体量を定量することにより評価した。
【結果】
ハマアザミ抽出物の脱顆粒阻害活性は、抗原刺激単独と比較し有意に低値を示し、特に葉で強い活性を示した。抽出物に含まれる成分の分画及び機器分析の結果、阻害活性成分を cirsimaritin と同定した。また、*in vivo* での評価の結果、抗原刺激単独投与群に比べ、ハマアザミ葉抽出物投与群では血清中の抗原特異 IgE 及び抗原特異 IgG1 が濃度依存的に低下し、また、糞中の抗原特異 IgA 量が増加することが明らかとなった。

Circimaritin, Cirsium maritimum, anti-allergy

講演番号：2C13p12
講演日時：3 月 18 日 17:05～ C 校舎 13 会場

# アズキ種皮に含まれる紫色色素の構造と発色機構

# Structure of purple pigments of red adzuki bean and the coloring mechanism

○永井 伸和[1]、市川 由樹[1]、尾山 公一[2]、近藤 忠雄[1]、吉田 久美[1] ([1]名大院・情報科学、[2]名大物国セ)
○Nobukazu NAGAI[1], Yoshiki ICHIKAWA[1], Kin-ichi OYAMA[2], Tadao KONDO[1], Kumi YOSHIDA[1] ([1]Grad. Sch. Info. Sci., Nagoya Univ., [2]RCMS, Nagoya Univ.)

【目的】アズキ種皮に含まれる色素の研究には 80 年以上の長い歴史があり、1934 年に黒田らがアントシアニン系の赤色色素とタンニン系の褐色色素が含まれると報告したことに始まる[1)]。我々は 1996 年に赤アズキ種皮にシアニンが含まれることを明らかにしたが[2)]、その含有量は極めて微量であったため、他の色素の存在が示唆された。その後、種皮に脂溶性の紫色色素(AZ-1,2)を検出し、その単離と構造決定を目的として研究を行ってきた。今回、分解反応と誘導体化、並びにモデル化合物の合成により AZ-1 の構造を決定したので報告する。

【方法・結果】赤アズキ 12 kg から酢酸エチルで色素を抽出し、種々のカラムクロマトグラフィーを繰り返すことにより AZ-1 を 23 mg 単離した。各種 NMR 測定により構造解明を試みたが、四級炭素が多く、通常の二次元測定では決定に至らなかった。AZ-1 溶液は不安定で、酸素と光の存在下で容易に AZ-1d へと分解することが分かった。HR-MS により、AZ-1 および AZ-1d の分子量をそれぞれ $C_{30}H_{20}O_{11}$、$C_{29}H_{20}O_{12}$ と決定した。AZ-1d の誘導体化によりその構造を決定し、AZ-1 の構造を図 1 であると導き出した。シアニジンとカテキンが縮環した新規な構造を有することが分かった。高濱らが報告した構造とは異なっており[3)]、これは結合位置の決定法に問題があったのではないかと推測される。現在、紫色発色機構の解明を目指し、発色団のモデル化合物 **A** の合成を進めている。

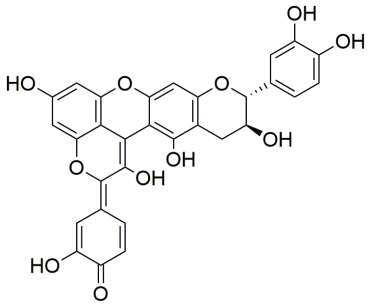


図 1 紫色色素 AZ-1 の構造.

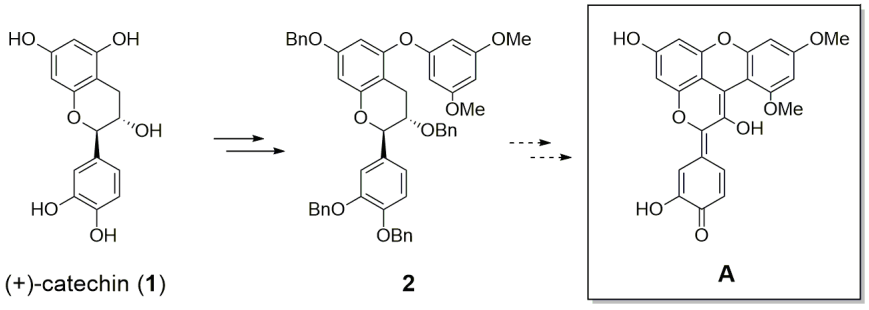



図 2　モデル化合物 **A** の合成スキーム.

1) C. Kuroda, M. Wada *Proc. Imp. Acad.,* **1934**, 10, 472-474.
2) K. Yoshida et al. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **1996**, 60, 589-593.
3) U. Takahama et al. *Food Chem.*, **2013**, 141, 282-288.

*Vigna angularis*, purple pigments of red adzuki bean, (+)-catechin

講演番号：2C13p13
講演日時：3 月 18 日 17:20～ C 校舎 13 会場

# Oligonol®の構成成分の単離・同定とその生理活性

# Isolation, identification and bioactivity of components in Oligonol®

○片山 明香[1]、柏木 丈拡[1]、島村 智子[1]、高橋 麻起子[2]、中東 淳[2]、受田 浩之[1] ([1]高知大農、[2]（株）アミノアップ化学)
○Sayaka KATAYAMA[1], Takehiro KASHIWAGI[1], Tomoko SHIMAMURA[1], Makiko TAKAHASHI[2], Jun NAKAHIGASHI[2], Hiroyuki UKEDA[1] ([1]Kochi Univ., [2]AMINO UP CHEMICAL CO.,Ltd.)

**【目的】**

ライチ (*Litchi chinensis*) はムクロジ科に属する果樹で、熱帯、亜熱帯地域で栽培されている。ライチの実は赤い果皮、白く多汁質の果肉、大きな種を持ち、その果肉は食用にされる。果皮はプロアントシアニジンをはじめとする高分子のポリフェノールを含有している。プロアントシアニジン類は様々な生理活性を持つことが知られているが、分子量が大きいため消化管で吸収されにくく、生体内での活性は限定的であった。ライチ由来の高分子ポリフェノールを低分子化することで、消化吸収性を向上させ、より生体内での効果を高めた機能性素材が Oligonol®である。これまで Oligonol®の生理活性について様々な研究が行われているものの、その組成については未だ不明な点が多い。本研究では、Oligonol®の構成成分を単離・同定し、各構成成分の機能性の測定を行った。

**【方法】**

Oligonol®を試料とし、中圧カラムクロマトグラフィー、限外ろ過、HPLC を用い、構成成分の単離・精製を行った。各画分の構成成分の追跡にはLC-MSを用いた。NMR 及びLC-MS (LC-MS/MS) の分析により、単離した化合物の構造解析を行った。機能性の評価は、DPPH ラジカル消去活性、スーパーオキシドアニオン消去活性、α-グルコシダーゼ阻害活性、ヒアルロニダーゼ阻害活性について測定し、活性の強さは 50%効果濃度で評価した。

**【結果】**

Oligonol®20 g を水に懸濁し、酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を排除限界 10,000 の限外ろ過膜を用いて、高分子成分を除去した後、ODS 中圧カラムクロマトグラフィーに供し、水、20% MeOH/水、40% MeOH/水、100% MeOH で順次溶出し、各画分を LC-MS で分析した結果、40% MeOH/水溶出部にカテキンの二量体、三量体,及び四量体由来のイオンピークが検出された。この 40% MeOH/水溶出部を ODS プレパックカラム (SNAP ULTRA C18 60 g, Biotage Japan) を用いて、30% MeOH/水及び 40% MeOH/水で溶出し 50mL ずつ分画した。続いて、逆相系の HPLC を用い各成分ごとに単離・精製を行った。構造解析の結果、30% MeOH/水溶出部からは epicatechin-(2β→*O*→7, 4β→6)-*ent*-catechin などの A タイプのプロシアニジンが、40% MeOH/水溶出部からは、rutin、及び kaempferol rutinoside といったフラボノイド配糖体が単離・同定された。現在、単離した各化合物についてその機能性の測定を行っている。

Oligonol, proanthocyanidin, bioactivity

発表責任者：柏木丈拡（tkashi@kochi-u.ac.jp）

講演番号：2C13p14
講演日時：3 月 18 日 17:35～ C 校舎 13 会場

LC-MS-MS を用いたパッションフルーツ種子中のフェノール性化合物の分析
Identification of phenolic components from the passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds by LC-MS-MS

梅原 将洋[1]、野中 詩織[1]、○大久保 絢夏[1]、柳江 高次[1]、古屋 俊樹[2,3]、木野 邦器[2]、齋 政彦[1] ([1]森永製菓（株）、[2]早大理工・応化、[3]東理大理工)
Masahiro UMEHARA[1], Shiori NONAKA[1], ○ Ayaka OHKUBO[1], Koji YANAE[1], Toshiki FURUYA[2,3], Kuniki KINO[2], Masahiko SAI[1] ([1]Morinaga & Co., Ltd., [2]Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ, [3]Fac. Sci. Tec., Tokyo Univ. Sci.)

【背景・目的】我々はこれまでにパッションフルーツ種子中にはピセアタンノールやスキルプシン B といったスチルベン化合物が含まれていること、またこれら化合物が NO 産生による血管拡張作用やメラニン合成抑制作用などの有用な生理活性を有していることを報告しており[1), 2)]、このパッションフルーツ種子抽出物を「パセノール™」と名付けて独自の健康素材とした。一方、ブドウの果皮やジョオウヤシの種子には、ピセアタンノールの類似体であるイソラポンチゲニンやペンタヒドロキシスチルベンが含まれていることに着目し、パッションフルーツ種子中にもピセアタンノールやスキルプシン B 以外に類縁の生理活性物質が含まれていると考えた。そこで本研究では、LC-MS による MRM 法を用いて、パッションフルーツ種子中の各種ポリフェノールの成分分析を行った。
【方法・結果】パッションフルーツ(*Passiflora edulis*)種子から抽出液を調製した後、LC-MS-MS 分析を行った。LC-MS-MS のフラグメントパターンおよび標準品との保持時間を比較したところ、報告しているピセアタンノール、スキルプシン B およびレスベラトロール以外に、エピカテキンやカフェ酸など数種類のフェノール性化合物を含有していることを確認した。また、MRM 分析によって、ピセアタンノールのメチル化体が 2 種類含まれていることが示され、ひとつは標準品との比較により、イソラポンチゲニンであることがわかった。さらに、3 種類の標準品を合成して比較したところ、残りのメチル化体は 3,4,5'-トリヒドロキシ-3'-メトキシスチルベンであることが明らかになった。また、MRM 分析によりペンタヒドロキシスチルベンを分析したところ、数種類のピークが観察され、そのうちひとつは合成した標準品[3)]との比較から、3,3',4',5,5'-ペンタヒドロキシスチルベンであることがわかった。3,4,5'-トリヒドロキシ-3'-メトキシスチルベンと 3,3',4',5,5'-ペンタヒドロキシスチルベンが食品中から見出されたのは初めてである。これら化合物の抗酸化活性も評価したので、併せて報告する。

1) Y. Matsui, K. Sugiyama, M. Kamei, T. Takahashi, T. Suzuki, Y. Katagata, T. Ito, *J. Agric. Food Chem.*, 58, 11112-11118 (2010).
2) S. Sano, K. Sugiyama, T. Ito, Y. Katano, A. Ishihata, *J. Agric. Food Chem.*, 59, 6209-6213 (2011).
3) T. Furuya, M. Sai, K. Kino, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 80, 193-198 (2016).

phenolic compound, *Passiflora edulis*, LC-MS-MS

講演番号：2C13p15
講演日時：3 月 18 日 17:50～ C 校舎 13 会場

ラズベリー‘ヒンボートップ’種のポリフェノール類分析と機能性評価研究
Quantitative analysis of polyphenol derivatives and functionality evaluation of raspberry 'Himbo-Top'

○小堀 亮[1]、八上 修一[2]、西村 拓哉[1]、道下 僚[1]、奥井 志穂[1]、重金 大貴[1]、川崎 崇[3]、齊藤 安貴子[1,2] ([1]大阪電通大工・環境、[2]大阪電通大院工・先端、[3]立命館大・薬)
○Ryo Kobori[1], Syuichi Yakami[2], Takuya Nishimura[1], Ryo Doge[1], Shiho Okui[1], Daiki Shigekane[1], Takashi Kawasaki[3], Akiko Saito[1,2] ([1]Faculty of Engineering, Osaka Electro-Communication University, [2]Graduate School of Engineering, Osaka Electro-Communication University, [3]Department of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University)

【目的】

ベリー系果物は一般的にポリフェノール化合物が多く含まれていることが知られおり、その機能性の高さから健康維持効果・疾病予防効果が期待されている。我々はポリフェノールの中でも proanthocyanidin（以後 PA）と呼ばれる極めて高い抗酸化機能を持つ化合物群に興味を持ち研究を進めてきた。PA は、フラバン-3-オールが縮合した構造を有し、お茶やカカオなどの嗜好品、大豆や小麦、古代米などの穀物類、リンゴやブドウなどの果物類など、様々な作物に含まれている無色、あるいは薄い褐色の化合物である。しかし PA は構成ユニットの構造・立体の違いや修飾の有無などから多くの類縁体が同時に存在するため単離が難しく構造-活性相関研究が進んでいない。そこで我々はこれまでに有機合成の手法を用い、様々な構造を持つ PA を選択的に合成してライブラリーとして保存し、機能性解析や定量分析に用いてきた。本発表では、ベリー系果物の中でラズベリーに注目して栽培を行い、果実が成熟する段階ごとのポリフェノール成分分析、及び、機能性評価を行ったので報告する。

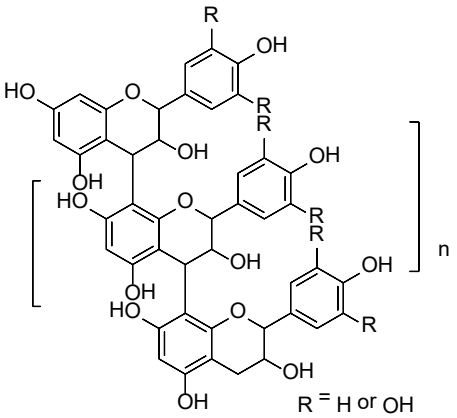


**Figure 1.** Structure of PA

【方法・結果】

ラズベリーとして 2 季なり種のヒンボートップを選択し、土壌栽培、及び、砂を根の保持剤とした砂栽培によりラズベリー果実を得た。果実を開花からの経過日数で 8 段階の成長ステージに分類し、それぞれをメタノールで抽出・濃縮乾固後、DMSO 溶液とした。この抽出液を用いて総ポリフェノール量分析 (Folin Ciocalteu 法)、総 PA 量分析[1]を行ったところ、果実の成熟に伴い、総ポリフェノール量、総 PA 量が共に減少した。また、DPPH ラジカル消去活性試験においてもポリフェノール量などの結果と相関が得られ、果実成熟に従ってラジカル消去活性が低下した。含有成分に関しては、抽出液の LC–MS 分析を行ったところ、合成標準サンプルとの比較により(+)-catechin と(–)-epicatechin が 2 量化した procyanidin B4 が含まれていることが確認でき、果実の成熟に伴い含有量が減少することを確認した。

1) Cáceres-Mella, A. *et al*., *Int. J. Food Sci. Tech.* 2013, **48**, 2588–2594.

raspberry, polyphenol, proanthocyanidin

発表責任者：齊藤安貴子（a-saito@osakac.ac.jp）

講演番号：2C13p16
講演日時：3 月 18 日 18:05～ C 校舎 13 会場

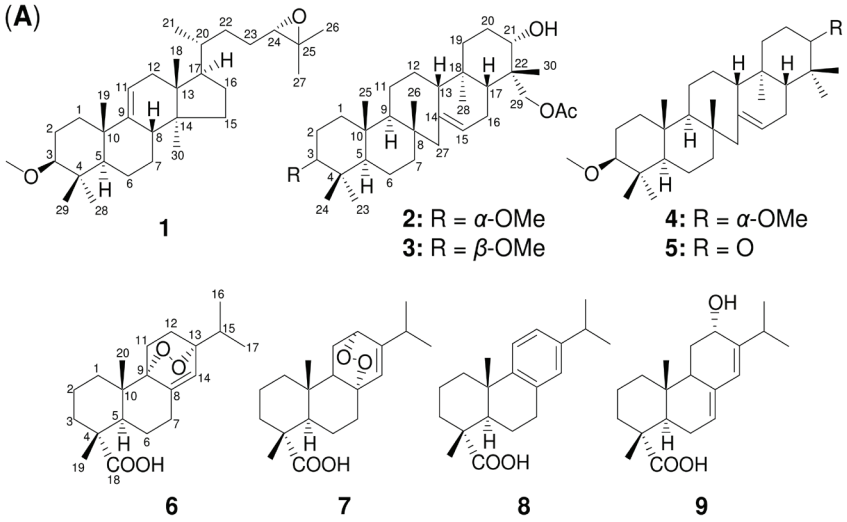
アカマツ（*Pinus densiflora*）根からの抗マラリア活性を有する新規トリテルペノイド
Two new triterpenoids from the roots of *Pinus densiflora*
○大高 潤之介[1]、小松 雅史[2]、宮崎 安将[2]、二村 友史[1]、長田 裕之[1]（[1]理研 CSRS、[2]森林総研）
○Junnosuke OTAKA[1], Masabumi KOMATSU[2], Yasumasa MIYAZAKI[2], Yushi FUTAMURA[1], Hiroyuki OSADA[1] ([1]RIKEN CSRS, [2]FFPRI)

【目的】

アカマツ（*Pinus densiflora*, Japanese red pine）は日本、朝鮮半島、中国北西部に分布する常緑針葉樹である。幹部は木材として利用され、松脂は接着剤、ニス、食品添加剤へ応用可能である。さらに、アカマツは古来より化学的成分、生態学、生理活性の研究対象であった。その一方で、根部における terpenoids 成分研究および生理活性の調査はまったく実施されていない。そこで、本研究ではアカマツ根に含まれる生理活性物質を調査することを目的とした。

【結果】

GC/MS, LC/MS を活用したアカマツ根部代謝物の解析（我々の研究グループでは植物や微生物培養物から調整したエキスを常法に従って分画したフラクションライブラリーを作製している）、および各種クロマトグラフィーを実施することにより、hexane 相から、2 種の新規 triterpenoids; (24*S*)-3$\beta$-methoxy-24,25-epoxy-lanost-9(11)-ene（**1**）, 29-acetoxy-3$\alpha$-methoxy serrat-14-en-21$\alpha$-ol（**2**）を既知 triterpenoids 3 種(**3**–**5**)および既知 diterpenoids 4 種（**6**–**9**）とともに単離した。得られた化合物群の化学構造は NMR, MS などにより決定した。すべての化合物に対して、抗ガン、抗マラリア、抗菌活性試験を *in vitro* で測定した結果、**1**, **2** はそれぞれ $IC_{50}$ = 32, 9.9 μM の濃度で抗マラリア活性を示した。[1)]




1) Otaka, J., Komatsu, M., Miyazaki, Y., Futamura, Y. and Osada, H. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, accepted. (2016).

*Pinus densiflora*, roots, triterpenoid

講演番号：2C14a01
講演日時：3 月 18 日 09:20～ C 校舎 14 会場

# 線虫 *C. e.elegans* の筋肉型および神経型ニコチン性アセチルコリン受容体に対する Paraherquamide A の阻害活性発現機構

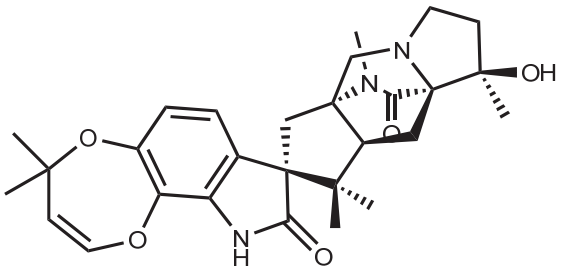
# Molecular mechanisms of inhibitory actions of paraherquamide A on *C. e.elegans* nicotinic acetylcholine receptor

○伊原 誠[1]、小鑓 亮平[1]、古谷 章悟[1]、甲斐 建次[2]、林 英夫[2]、David B. SATTELLE[3]、松田 一彦[1]（[1]近畿大農、[2]阪府大生環科、[3]UCL）

○Makoto IHARA[1], Ryosuke KOYARI[1], Shogo FURUTANI[1], Kenji KAI[2], Hideo HAYASHI[2], David B. SATTELLE[3], Kazuhiko MATSUDA[1] ([1]Fac. of Argi., Kindai Univ., [2]Grad. Sch. Life Env. Sci., Osaka Pref. Univ., [3]UCL)

[目的] ニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)は，ネオニコチノイドや spinosad，levamisole をはじめとする種々の農薬・駆虫薬の分子標的となっている．nAChR はアセチルコリンを天然のリガンドとする神経伝達を担うリガンド開口イオンチャネルであり，無脊椎動物では主に神経中枢にて興奮性の神経伝達を担っている．合成殺虫剤ネオニコチノイドなどは，nAChR のオルソステリック部位に結合して，アゴニスト，アンタゴニスト，アロステリックモジュレータなどとして機能する．

nAChR を分子標的とする化合物の一つに Paraherquamide がある．Paraherquamide は糸状菌 *Penicillium paraherquii* の培養液より単離されたオキシインドール化合物であり，Paraherquamide A から K およびその酸化物を含む多くの類縁化合物がこれまでに単離されている．これまでに Paraherquamide A は線虫 *Ascaris summ* の筋肉組織の nAChR に対するアセチルコリン（ACh）のアゴニスト作用を拮抗的に阻害すると報告されている．しかし我々は *C. elegans* の nAChR に対しては本化合物が非拮抗的に阻害することを見出した．そこで本研究では，情報学および構造生物学的アプローチに基づいて Paraherquamide A の nAChR による分子認識に迫ることを目的に研究を展開したので報告する．



Paraherquamide A

[方法と結果]これまでの電気生理学的解析に基づき，Paraherquamide A は nAChR のオルソステリック部位に結合して活性を発現していると予測し，nAChR の細胞外リガンド結合ドメインのサロゲートタンパク質であるアセチルコリン結合タンパク質（AChBP）を用いて相互作用部位について検討した．Paraherquamide A はオカラ培地を用いて糸状菌によって生産させ，液-液分配，順相および逆相カラムクロマトグラフィーによって精製することによって著量得た．AChBP は *Pichia pastoris* によって機能発現させ，イオン交換クロマトグラフィー，ゲルろ過クロマトグラフィーによって調製し，それらを混合し，相互作用させた後に蒸気拡散法による共結晶化を試みた．結晶化スクリーニングの結果，ポリエチレングリコールを主成分とし，種々の無機および有機塩を少量含む沈殿剤を含む条件で良好な結晶が得られることが明らかになった．現在，結晶化条件の最適化と情報学的アプローチによる Paraherquamide A-nAChR 間相互作用の分子機構について解析を進めている．

Paraherquamide, nicotinic acetylcholine receptor (nAChR), *Penicillium*

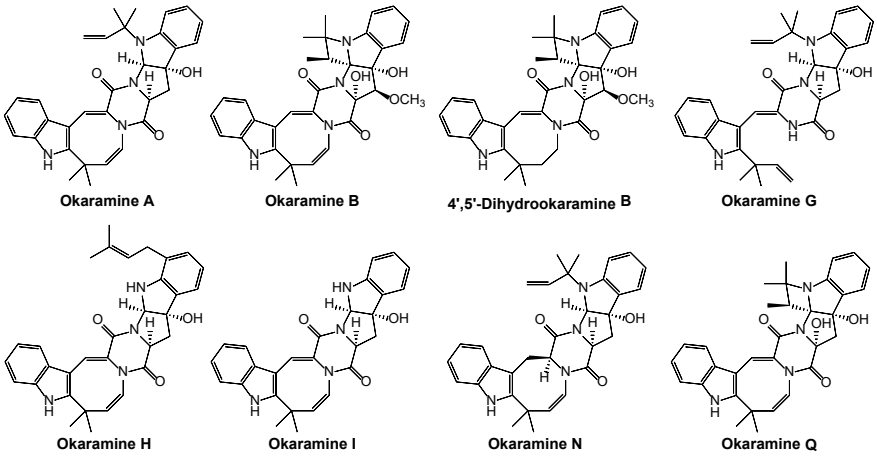
講演番号：2C14a02
講演日時：3 月 18 日 09:35～ C 校舎 14 会場

昆虫抑制性グルタミン酸受容体活性化作用に関する okaramine 類の構造活性相関
Structure-activity relationship of activating action of okaramines on insect glutamate-gated chloride channels

○野口 晃[1]、古谷 章悟[1]、伊原 誠[1]、甲斐 建次[2]、林 英雄[2]、大髙 潤之介[3]、衣笠 清美[3]、加藤 直樹[3]、高橋 俊二[3]、長田 裕之[3]、松田 一彦[1] ([1]近大農、[2]阪府大生環科、[3]理研 CSRS)
○Akira NOGUCHI[1], Shogo FURUTANI[1], Makoto IHARA[1], Kenji KAI[2], Hideo HAYASHI[2], Junnosuke OTAKA[3], Kiyomi KINUGASA[3], Naoki KATO[3], Shunji TAKAHASHI[3], Hiroyuki OSADA[3], Kazuhiko MATSUDA[1] ([1]Fac. of Agri., Kindai Univ., [2]Grad. Sch. Life Env. Sci., Osaka Pref. Univ., [3]RIKEN CSRS)

【目的】*Penicillium simplicissimum* が産生するインドールアルカロイド okaramine 類は昆虫の抑制性グルタミン酸受容体（GluCl）に作用し、殺虫効果を発揮する。我々はこれまでに okaramine 類の中で okaramine B が最強の殺虫活性と GluCl 活性化作用を示すことを明らかにしているが、本化合物が有する各部分構造がどの程度これらの活性に貢献しているのか十分理解されていない。本研究では、カイコガ GluCl に対する okaramine 類の活性化作用について構造活性相関を詳細に検討したので報告する。
【方法と結果】Okaramine H を除く okaramine 類は *Penicillium simplicissimum* AK-40 株の培養物から単離し、okaramine H は okaramine 生合成遺伝子 *oka7* を欠損した本菌の変異株の培養物から獲得した。アフリカツメガエル卵母細胞に発現させたカイコガ GluCl に対する活性は、本受容体の活性化により生じる塩素電流を二電極膜電位固定法で測定することにより評価した。

Okaramine A は okaramine I より高い GluCl 活性化作用を示すことからインドール環のプレニル化は GluCl 活性化作用の発現に必須である。しかし、プレニル基が okaramine A のインドール環の窒素からベンゼン環の炭素に転移し okaramine H に変化すると大きく GluCl 活性化作用が低下することから、インドール環の窒素がプレニル化されることは活性発現においても生合成においても重要であると考えられた。また、okaramine A は okaramine G より高い GluCl 活性化作用を示し、okaramine B は okaramine Q より高い GluCl 活性化作用を示すことから、azocine 環と methoxy 基はどちらも本活性の発現に貢献していることがわかった。さらに、okaramine B の azocine 環の 4’,5’-二重結合を還元し 4’,5’-dihydrookaramine B に変化させても GluCl 活性化作用はさほど低下しないが、7’,8’-二重結合が単結合に変化し okaramine N になると顕著に GluCl 活性化作用が低下することから、7’,8’-二重結合の方が 4’,5’-二重結合より本活性の発現において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。




Okaramine, Glutamate-gated chloride channel, structure-activity relationship

発表責任者：松田一彦（kmatsuda@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：2C14a03
講演日時：3 月 18 日 09:50～ C 校舎 14 会場

# ライム病を媒介するシカダニ（*Ixodes scapularis*）の抑制性グルタミン酸受容体のアゴニストおよびアンタゴニストプロフィールと okaramine 類の活性発現機構

# Agonist and antagonist profiles of glutamate-gated chloride channel of a Lyme disease vector *Ixodes scapularis* and mode of actions of okaramines

○古谷 章悟[1]、伊原 誠[1]、甲斐 建次[2]、林 英雄[2]、Kristin Lees[3]、Freddie A. Partridge[3]、Steven Buckingham[3]、David B. Sattelle[3]、松田 一彦[1]（[1] 近大農、[2] 阪府大生環科、[3]University College London）

○Shogo FURUTANI[1], Makoto IHARA[1], Kenji KAI[2], Hideo HAYASHI[2], Kristin Lees[3], Freddie A. Partridge[3], Steven Buckingham[3], David B. Sattelle[3], Kazuhiko MATSUDA[1] ([1]Fac. of Agri., Kindai Univ., [2]Grad. Sch. Life Env. Sci., Osaka Pref. Univ., [3]University College London)

【目的】糸状菌 *Penicillium simplicissimum* が産生するプレニル化インドールアルカロイドである okaramine は無脊椎動物特有の神経受容体である抑制性グルタミン酸受容体（GluCl）に作用し、殺虫効果を発揮する[1,2]。これまで、okaramine 類の GluCl に対する作用はカイコガ幼虫の GluCl に対してのみ調べられているだけで、他の無脊椎動物の GluCl に対してもカイコガ幼虫の GluCl と同様に作用するのかどうか全く調査されていない。シカダニ（*Ixodes scapularis*）はマダニ類に属し、ライム病を媒介することで知られている。本研究では okaramine 類の作用機構も含めて本種の GluCl（IscaGluCl1）の薬理学的特性について検討したので報告する。

【方法と結果】RT-PCR によりシカダニから単離した IscaGluCl1 は全長 449 アミノ酸からなり、ウシダニ（*Rhipicephalus microplus*）の GluCl と 94%の相同性を示した。cRNA をマイクロインジェクションすることで IscaGluCl1 をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、L-および D-グルタミン酸に対する本受容体の応答性を膜電位固定法によって電気生理学的に調べた結果、IscaGluCl1 は L-グルタミン酸により選択的に活性化された。イボテン酸も IscaGluCl に対してアゴニストとして作用したが、その活性化効率は L-グルタミン酸より劣っていたことからパーシャルアゴニストとして作用することがわかった。GluCl の阻害剤として知られる天然物 picrotoxinin と合成殺虫剤 fipronil の IscaGluCl1 に対する作用を調べたところ、picrotoxinin と fipronil はどちらも L-グルタミン酸による本受容体の活性化を低濃度で阻害した。

Okaramine 類の中で最も高い殺虫活性を示す okaramine B を IscaGluCl1 を発現させた卵母細胞に処理したところ、本受容体を濃度依存的に活性化し、持続的に流れる塩素電流を誘起することがわかった。さらに、1 μM の okaramine B を 30 秒前処理したのちに L-グルタミン酸と共処理したところ、L-グルタミン酸の半数効果濃度にはほとんど影響を及ぼさずに活性化効率を選択的かつ顕著に増大させた。このことから、okaramine B は IscaGluCl1 に対してポジティブアロステリックモジュレーターとして作用することが明らかとなった。

1. H. Hayashi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **79**, 877-887 (2015).
2. S. Furutani *et al*., *Sci. Rep.* **4**, 6190 (2014).

okaramine, Glutamate-gated chloride channel, *Ixodes scapularis*

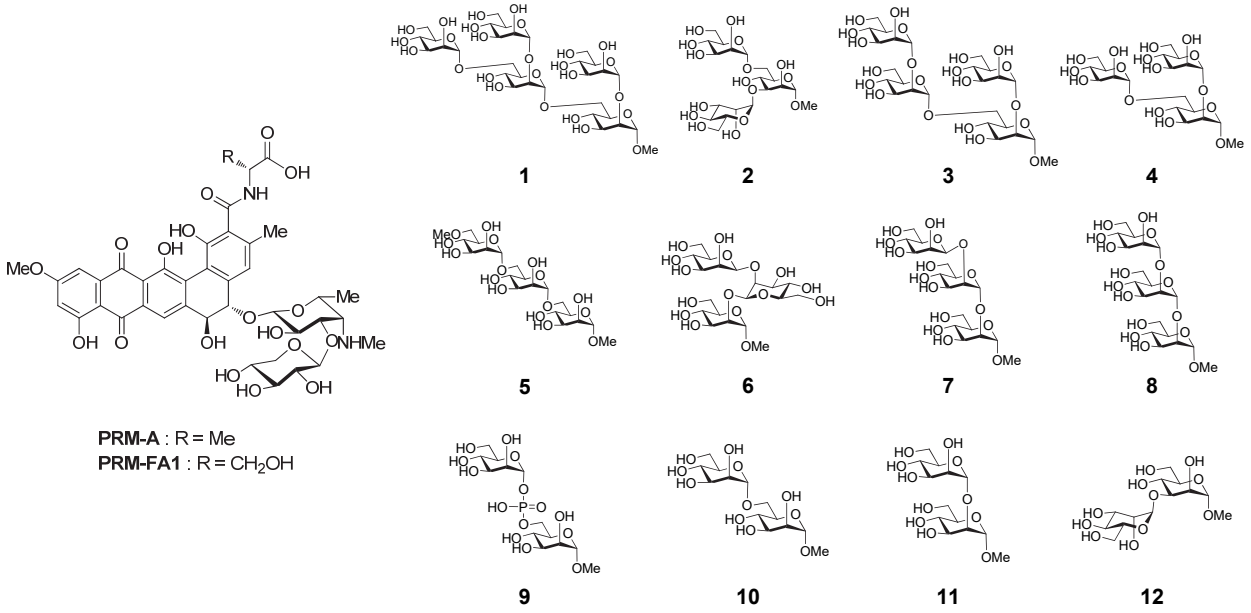
講演番号：2C14a04
講演日時：3 月 18 日 10:05～ C 校舎 14 会場

# 真菌マンナンのオリゴ糖モチーフに対するプラディミシンの結合活性
# Binding activity of Pradimicin for oligosaccharide motifs of fungal mannans

○山地 史哉[1]、中川 優[1,2]、渡邉 泰典[1]、五十嵐 康弘[3]、伊藤 幸成[2]、小鹿 一[1] ([1]名大院・生命農、[2]理研、[3]富山県大・生工)
○Fumiya Yamaji[1], Yu Nakagawa[1,2], Yasunori Watanabe[1], Yasuhiro Igarashi[3], Yukishige Ito[2], Makoto Ojika[1] ([1]Nagoya University, [2]RIKEN, [3]Toyama Prefectural University)

【目的】プラディミシン類 (PRM) は, 真菌の細胞壁マンナンに結合して抗真菌活性を示すユニークな抗生物質群である. PRM は細胞壁マンナン中のマンノース残基にランダムに結合しているのではなく, 特定のマンノオリゴ糖モチーフを認識していることが指摘されているが, PRM の標的となるモチーフは明確にされていない. そこで本研究では, *Candida albicans* の細胞壁マンナンに特徴的なマンノオリゴ糖モチーフを化学合成し, 各モチーフに対する PRM の結合活性を評価することを目的とした.

【方法および結果】 *Candida albicans* の細胞壁マンナンは, D-マンノースが α-1,6 結合で連結した主鎖に, α-1,2, α-1,3, α-1,6, および β-1,2 結合を有するマンノオリゴ糖が側鎖として付加した櫛形構造を基本骨格としている. そこで, マンナンの主鎖および側鎖構造に対応するマンノオリゴ糖モチーフを十二種 (**1**~**12**) 合成し, 抗真菌試験および共沈殿試験により, 二種の PRM (PRM-A, PRM-FA1) に対する結合活性を評価した. その結果, いずれの試験においても, PRM は **1**, **2**, **3** に高い結合活性を示すことが明らかになった. 本結果は, 二つの非還元末端 Man 残基が空間的に近接する側鎖モチーフに PRM が選択的に結合することを示唆している.




carbohydrate recognition, cell-wall mannan, Pradimicin

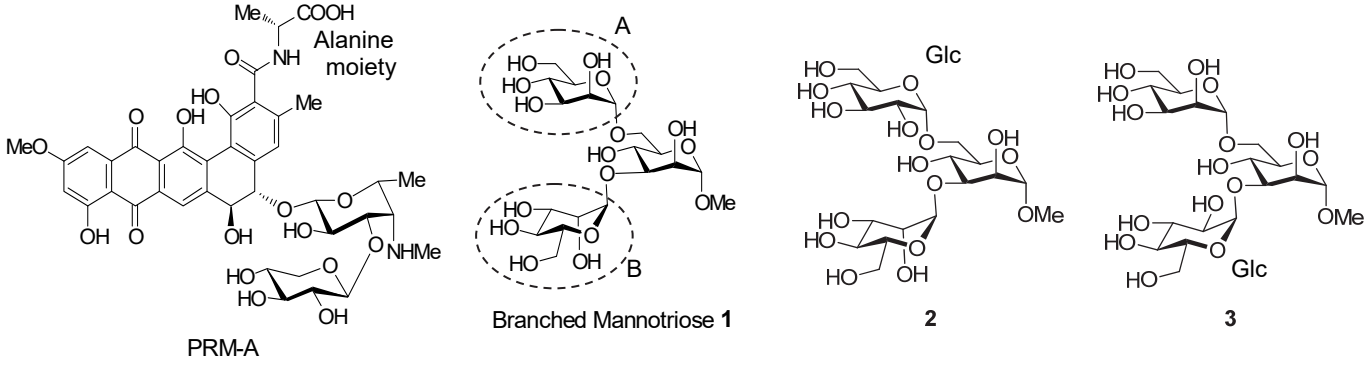
講演番号：2C14a05
講演日時：3 月 18 日 10:20～ C 校舎 14 会場

プラディミシン A とマンノトリオースとの結合様式の解析
Binding mode analysis of pradimicin A with mannotriose

○渡邉 泰典[1]、中川 優[1,2]、山地 史哉[1]、土井 崇嗣[3]、竹腰 清乃理[3]、五十嵐 康弘[4]、伊藤 幸成[2]、小鹿 一[1] ([1]名大院・生命農、[2]理研、[3]京大院・理、[4]富山県大・生工)
○ Yasunori WATANABE[1], Yu NAKAGAWA[1,2], Fumiya YAMAJI[1], Takashi DOI[3], Kiyonori TAKEGOSHI[3], Yasuhiro IGARASHI[4], Yukishige ITO[2], Makoto OJIKA[1] ([1]Nagoya Univ., [2]RIKEN, [3]Kyoto Univ., [4]Toyama pref. Univ.)

【目的】 プラディミシン A (PRM-A) は，$Ca^{2+}$ 存在下で D-mannose (Man) に結合するユニークな抗生物質である． PRM-A は，直鎖のオリゴマンノースよりも分岐構造を有するマンノトリオース (**1**) に極めて強く結合することが明らかになっているが，その要因は明確になっていない．そこで本研究では，PRM-A と **1** との結合様式に関する知見を得ることを目的とした．

【方法・結果】 PRM-A は **1** の二つの非還元末端 Man 残基を同時に認識していると考えられている. 本仮説を検証するため, 非還元末端 Man 残基 A および B を PRM-A と結合しない D-glucose (Glc) に置換した三糖 (**2**, **3**) を合成し，PRM-A との結合試験を行った．その結果，PRM-A に対する **2** および **3** の結合活性は，**1** に比べて大幅に低いことが確認された．本結果より，PRM-A は Man 残基 A および B を同時に認識していることが明らかとなった．さらに，PRM-A と **1** の結合様式を調べるため，PRM-A/**1** 複合体の固体 NMR 解析を行った．三糖 **1** の Man 残基 A, B を個別に $^{13}C$ 標識した二種の $^{13}C$ 標識体を合成し，アラニン部分を $^{13}C$ 標識した PRM-A との複合体を凝集体として調製した．$^{13}C$ 間の距離相関を評価できる固体 NMR 法 dipolar-assisted rotational resonance (DARR) 法により PRM-A のアラニン部分と各 $^{13}C$ 標識 Man 残基との距離を評価した結果，アラニン部分には **1** の Man 残基 A よりも B が近接していることが示唆された．本結果より，PRM-A は Man 残基 A, B にランダムに結合するのではなく，アラニン部分に Man 残基 B が近接する特定の複合体を形成している可能性が示唆された．




carbohydrate recognition, pradimicin, solid-state NMR

講演番号：2C14a06
講演日時：3 月 18 日 10:45～ C 校舎 14 会場

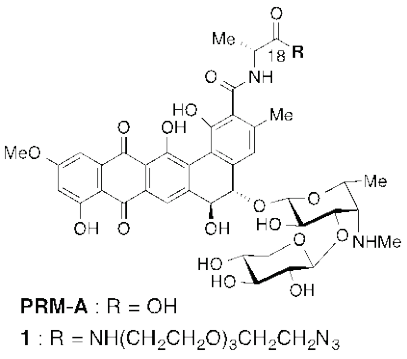
# 糖鎖を蛍光染色するプラディミシン誘導体の開発

# Development of a novel pradimicin derivative for fluorescent staining of glycans

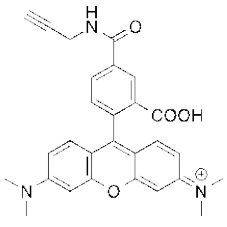
○都築 麗江[1]、中川 優[1,2]、戸村 友彦[1]、五十嵐 康弘[3]、伊藤 幸成[2]、小鹿 一[1]([1]名大院・生命農、[2]理研、[3]富山県大・生工)
○Kazue TSUZUKI[1], Yu NAKAGAWA[1,2], Tomohiko TOMURA[1], Yasuhiro IGARASHI[3], Yukishige ITO[2], Makoto OJIKA[1] ([1]Nagoya Univ., [2]RIKEN, [3]Toyama Pref. Univ.)

【目的】 Pradimicin A (PRM-A) は，D-mannose (Man) を認識するユニークな抗真菌性天然物である．近年，我々は「PRM-A の 18 位カルボキシル基は Man 結合活性に必須である」という従来の仮説を覆し，本カルボキシル基をアミド化しても Man 結合能が消失しないことを見いだした．そこで本研究では，PRM-A の 18 位カルボキシル基を構造修飾し，糖鎖を蛍光染色できる誘導体を開発することを目的とした．

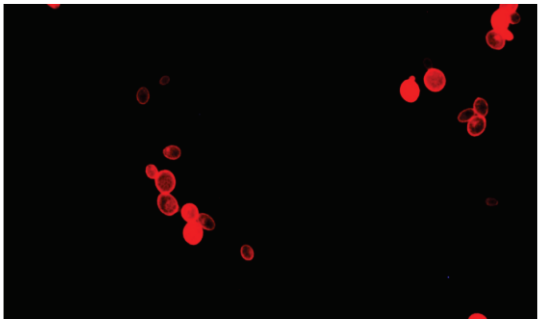
【結果】 任意の蛍光基をクリック反応で導入することを視野に入れ，PRM-A の 18 位カルボキシル基にスペーサーを介してアジド基を導入した誘導体 (**1**) を合成した．本化合物の糖結合能を等温滴定カロリメトリーおよび UV スペクトルによって評価したところ，**1** は糖鎖の主要な構成糖のうち，Man のみに結合し，極めて高い Man 結合特異性を示すことが確認された．さらに，大過剰の Man 存在下で **1** と蛍光基を有するアルキン (**2**) とのクリック反応が進行したことから，**1** と Man が結合した状態においてもクリック反応は容易に進行することが確認された．そこで，細胞壁にマンナン (Man を構成糖とする多糖) を有する真菌 *Candida rugosa* 存在下で **1** と蛍光基 (**2**) のクリック反応を試みたところ，細胞表面が蛍光染色されることが観察できた．本結果は，**1** が蛍光染色による糖鎖検出用ツール分子として利用できることを示唆するものである．




**PRM-A** : R = OH
**1** : R = $NH(CH_2CH_2O)_3CH_2CH_2N_3$




**2**



*Candida rugosa* の細胞壁マンナンの蛍光染色

carbohydrate detection, click chemistry, pradimicin

講演番号：2C14a07
講演日時：3 月 18 日 11:00～ C 校舎 14 会場

# 希少アルドヘキソースのがん細胞増殖抑制活性の評価

# Evaluation of Anti-Proliferative Activity of Rare Aldohexose

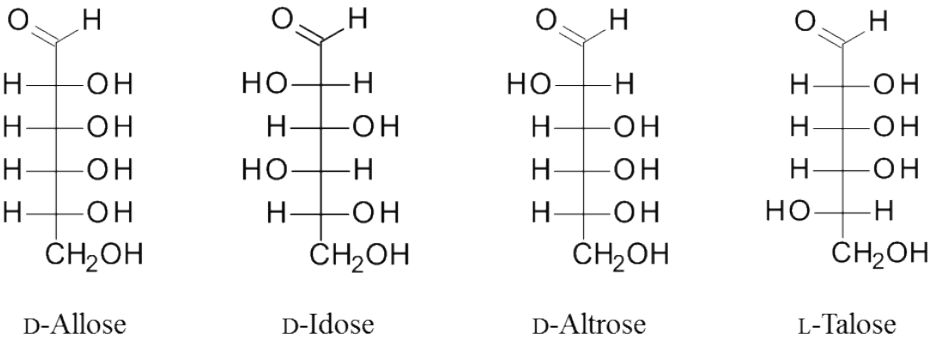
○竹本 和音[1]、柳田 亮[2]、佐藤 正資[2]、川浪 康弘[2] ([1]香大院農、[2]香大農)
○Kazune TAKEMOTO[1], Ryo YANAGITA[2], Masashi SATO[2], Yasuhiro KAWANAMI[2] ([1]Kagawa Univ., [2]Kagawa Univ.)

【目的】

天然に微量にしか存在しない希少糖は, 様々な生理活性をもつことが明らかにされている. 例えば, D-glucoseのC-3位のエピマーであるD-alloseは, 数種類のヒトがん細胞に対して増殖抑制活性を示す.[1] D-Alloseは正常細胞に対して毒性を示さないため, 新規作用機構を有する抗がん化合物として期待される. 一方で, D-alloseおよびにD-fructoseのC-3位のエピマーであるD-psicose以外の希少糖のがん細胞増殖抑制効果はこれまで調べられていなかった. そこで本研究では, 天然存在比の少ないアルドヘキソースのがん細胞増殖抑制活性の評価を行うことを目的とした.

【方法・結果】

これまでに, L-gulose, L-idose, L-talose, L-idoseの4種類の中で, L-taloseおよびD-idoseが, がん細胞増殖活性を示すことを見出している.[2] 本研究では, その他の希少アルドヘキソースの活性評価を進めた. MOLT-4Fヒト白血病細胞株を播種した96ウェルマイクロプレートに, 終濃度が1, 3, 5, 10, 20 mMになるように調整したサンプルを添加し, 37 ℃, 5% $CO_2$雰囲気下で48時間インキュベーションし, 生細胞数を定量した. D-Altroseは, 5 mMから濃度依存的に細胞増殖を抑制し, D-guloseは, 20 mMでわずかに増殖抑制活性が見られた. 発表では, その他の希少アルドヘキソースの生理活性についても報告する.




[1] Hirata, Y., *et al*. *J. Biosci. Bioeng*. **2009***, 107*, 562-568.
[2] 竹本和音ら, 2016年日本化学会中四国支部大会, 香川大会.

rare aldohexose, anti-proliferative activity, D-Allose

講演番号：2C14a08
講演日時：3 月 18 日 11:15～ C 校舎 14 会場

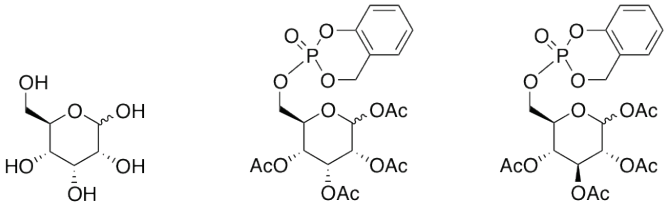
# がん細胞増殖抑制活性を示す D-allose-6-phosphate 誘導体の作用機構の解析

# Analysis of mechanism of action of D-allose-6-phosphate derivative with anti-proliferative activity

○石山 大展[1]、柳田 亮[2]、杉山 康憲[2]、川浪 康弘[2] ([1]香大院農、[2]香大農)
○ Hironobu ISHIYAMA[1], Ryo YANAGITA[2], Yasunori SUGIYAMA[2], Yasuhiro KAWANAMI[2] ([1]Kagawa Univ., [2]Kagawa Univ.)

[背景と目的] D-Allose は天然に稀にしか存在しない希少糖の一つであり，D-glucose の C3 位エピマーである．D-Allose は様々なヒトがん細胞株に対してがん細胞増殖抑制活性を示すが，正常細胞に対し毒性を示さないことから，副作用の少ない新規抗がん剤候補化合物として注目されている．しかし，D-allose が活性を示すためには比較的高い濃度が必要である．D-Allose が代謝された D-allose-6-phosphate (A6P) は細胞内に蓄積し，これが thioredoxin-interacting protein (TXNIP) を誘導することでがん細胞の増殖抑制が引き起こされることが報告されている．A6P は極性の高い糖構造とリン酸基の両方を含むため細胞膜を透過できないが，膜透過性を付与することで D-allose よりも高い活性を示すことが期待される．本研究は膜透過性 A6P 誘導体 **1** の合成と，MOLT-4F ヒト白血病細胞株に対する増殖抑制活性の評価を目的とした．

[結果と考察] A6P の C1 位から C4 位の水酸基をアセチル基で，リン酸基を CycloSal 基でマスクした誘導体 **1** を合成した. 化合物 **1** は MOLT-4F ヒト白血病細胞株に対して D-allose よりも約 250 倍高い活性を示した．しかし，D-allose が細胞死を誘導しないことが報告されているのに対して，**1** は 3 μM 以上の濃度で細胞を完全に死滅させた．このことは **1** が D-allose とは異なる作用機構により高い活性を示していることを示唆している．そこで，**1** と同様に水酸基とリン酸基を保護した D-glucose-6-phosphate (G6P) 誘導体を合成し活性を評価した. 化合物 **2** は **1** より低い活性を示したことから，糖部位 D-allose 構造の重要性が示唆された．次に，A6P 誘導体 **1** による MOLT-4F 細胞における TXNIP の発現誘導を調べた．化合物 **1** は D-allose と比較すると非常に弱いものの，TXNIP の発現を誘導した．これらの結果は，A6P 誘導体の高い活性が D-allose と同様の TXNIP 発現誘導と，異なる作用機構との相乗効果により引き起こされていることを示唆している．



| | D-allose | **1** | **2** |
|---|---|---|---|
| $GI_{50}$ for MOLT-4F | 1,300 μM | 5.2 μM | 42 μM |

D-allose, rare sugar, prodrug

講演番号：2C14a09
講演日時：3 月 18 日 11:30～ C 校舎 14 会場

# アミロイドβ凝集体に特異的に結合するクルクミン様物質の開発

# Design, synthesis and evaluation of curcumin derivatives for the interaction with amyloid beta aggregation

○今野 博行、二階堂 由莉、佐藤 多記（山形大院理工）
○Hiroyuki KONNO, Yuri NIKAIDO, Taki SATO (Yamagata Univ.)

<目的>
アルツハイマー病の原因物質として考えられている amyloid β (Aβ) は，アミノ酸残基 40-42 の凝集性の高いペプチドである．アルツハイマー病患者にはこの高度凝集体が蓄積した老人斑が観察される．最近の研究から Aβ 高度凝集体よりもサイズの小さい Aβ オリゴマーが神経細胞死を引き起こしアルツハイマー病が発症するという説が支持されつつあるものの，その詳細は未だ明らかにされていない．アルツハイマー病の根本治療に向け Aβ を標的とした薬剤探索研究は世界中で活発に行われている．

2004 年小野らはウコンの主成分クルクミンに Aβ 凝集阻害活性があると報告した.[1]しかしクルクミンは難水溶性物質であるため，阻害メカニズムの解析等が非常に難しく，研究の進展を妨げていた．そこで演者らは，クルクミンの芳香環上の置換基及びその位置を変更したクルクミン誘導体を設計，合成することで，天然物を上回る Aβ 凝集阻害活性を有する水溶性化合物の創成を行ってきた.[2,3] 今回更なる構造活性相関を進めることで最適構造の探索を行い，Aβ 凝集体の構造制御を検討した．

<方法と結果>
まずクルクミン誘導体の設計を行った．これまでに得た結果を元にフェノール性水酸基の位置を決定した．中央部スペーサー部に関しては C7，C5 ならびに C3 ユニットを設計し，Pabon 法あるいはアルドール縮合を用いることにした．二重結合，モノケトン，1,3-ジケトン構造等を作り分けることで様々な誘導体を調製した．その後，Aβ 凝集阻害活性をチオフラビン T (ThT) 法で評価した．その結果，強力な Aβ 凝集阻害（蛍光強度減少）を示す誘導体を見出した．一方で，凝集解離能のないメチルエーテル誘導体に蛍光強度を増加する効果があることを発見した．この現象は Aβ 凝集体の検出を可能にした.さらにシュミレーションの結果から Aβ 凝集体に対する両者の結合部位が異なることが示唆された．すなわち，凝集崩壊性クルクミン誘導体は Aβ 親水部に結合後凝集体を崩壊させ，メチルエーテルクルクミンは Aβ 疎水部に相互作用することで凝集体の安定化に寄与することがわかった．

1) Ono, K.; Hasegawa, K.; Naiki, H.; Yamada, M. *J. Neuro Research* **2004**, *75*, 742-750.
2) Konno, H.; Endo, H.; Ise, S. *et al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 865-870.
3) Endo, H.; Nikaido, Y.; Ise, S.; Konno, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2014**, *24*, 5621-5626.

amyloid beta, curcumin, Alzheimer's disease

発表責任者：今野博行（konno@yz.yamagata-u.ac.jp）

講演番号：2C14a10
講演日時：3 月 18 日 11:45～ C 校舎 14 会場

植物由来カフェ酸誘導体のアミロイドβ凝集阻害活性
Effect of Caffeic Acid Derivatives for the Inhibitory Activity of Amyloid Beta Aggrigation
○繁森 英幸[1]、木立 恵利[2]、栗栖 真奈美[2]、宮前 友策[1]、花木 瑞穂[3]、村上 一馬[3]、入江 一浩[3]（[1]筑波大生命環境、[2]筑波大院生命環境、[3]京大院農）
○Hideyuki SHIGEMORI[1], Eri KIDACHI[2], Manami KURISU[2], Yusaku MIYAMAE[1], Mizuho HANAKI[3], Kazuma MURAKAMI[3], Kazuhiro IRIE[3] ([1]Facul. Life Environ., Univ. of Tsukuba, [2]Grad. Sch. Life Environ., Univ. of Tsukuba, [3]Grad.Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【目的】アルツハイマー型認知症（AD）は世界的に最も多い神経変性疾患であり、高齢者における認知症の主な原因の一つである。近年の研究では、その発症にアミロイドβタンパク質（Aβ）の関与が示唆されている。凝集したAβが中枢神経系に蓄積すると強い神経細胞毒性が引き起こされ、神経系の機能低下が起こり、ADを発症すると考えられている。

本研究室の先行研究において、寄生植物ヤセウツボ（*Orobanche minor*）に含有される植物由来カフェ酸誘導体のActeosideに、顕著なAβ凝集阻害活性を見出した。そこで本研究では、神経変性疾患の予防、治療へ向けた基礎研究としてActeoside等のカフェ酸誘導体に着目し、化合物の有する機能や作用機序を明らかにしていくことを目的とした。

【方法および結果】(1) ヤセウツボ（*O. minor*）のメタノール抽出物から、シリカゲルカラムクロマトグラフィーならびに逆相 HPLC を用いて Acteoside 等のカフェ酸誘導体を単離し、NMR および MS により構造同定した。(2) 得られたカフェ酸誘導体について、Aβ凝集阻害活性試験（Th-T アッセイ、透過型電子顕微鏡による凝集形態観察、ウェスタンブロッティングによるオリゴマー観察）を行った。8 種のカフェ酸誘導体についてAβの凝集度合いを評価し、構造活性相関を検討した結果、Acteoside および Oraposide に顕著な活性が見出され、活性発現にはカフェ酸ならびにヒドロキシチロゾール部分のカテコール構造の存在および数が重要であることが示唆された。そこでカテコール構造が自動酸化を受け *o*-ベンゾキノンを形成し、Aβと相互作用を示すことで凝集を抑えるという仮説を立て、Aβに酸化剤として過ヨウ素酸ナトリウム($NaIO_4$)および還元剤として tris-(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP)を加え、自動酸化反応を促進および抑制する条件でカフェ酸誘導体を作用させ、Aβ凝集度合いの変化を検証した。その結果、酸化剤を加えると活性が強まり、一方で還元剤を加えると活性が弱まることから、上記の仮説を支持する結果が得られた。(3)抗酸化活性試験（DPPH ラジカル消去活性試験）に供した結果、カテコール構造の存在および数が重要であることが明らかになり、Aβ凝集阻害活性と抗酸化活性には相関関係があることが示唆された。

以上の結果により、Acteoside 等のカフェ酸誘導体が、種々の作用点で複合的に働き、神経細胞保護作用を示すことが示唆された。Acteoside 等は、オリーブやゴマといった食品中にも含まれるため、AD 予防を目的とした機能性食品等への応用が期待される。

caffeic acid derivatives, amyloid ß, acteoside

発表責任者：繁森　英幸（shigemori.hideyuk.fn@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：2C14p02
講演日時：3 月 18 日 14:15～ C 校舎 14 会場

# in vivo イメージングに適した水溶性向上型新規ルシフェリンアナログの開発

Development of the water-soluble improvement type new luciferin analog for in vivo imaging

○鉢呂 佳史[1]、齊藤 亮平[1]、木山 正啓[1]、北田 昇雄[1]、盛満 玲[1]、小畠 りか[2]、丹羽 治樹[3]、牧 昌次郎[1] ([1]電通大、[2]慶大、[3]脳科学ライフサポート研究センター)

○Yoshifumi HACHIRO[1], Ryohei Saito[1], Mssahiro Kiyama[1], Nobuo Kitada[1], Rei Morimitu[1], Rika Obata[2], Haruki Niwa[3], Syouzirou Maki[1] ([1]Dept. of engineer Science,Univ. of E.-comm, [2]Keio Univ, [3]Brain Science inspired life support research center,Univ. of E.-Comm)

当研究室では、有機化学の技術を用いることで基礎医学の発展を支える技術開発に取り組んできた。中でも、光を用いた in vivo イメージング技術が大きく発展し、生体内深部を観察することができれば、これまで以上に多くの知見を得られ、基礎医学が大きく発展すると期待できる。

ここで、生体内深部イメージングを非常に困難にしているのが、生体組織による光の吸収と散乱である。しかし一方で近赤外領域の光は生体組織に対して透過性が高いということは一般的に知られている。このようなことを踏まえ、当研究室では近赤外領域の光を発するイメージング材料を開発することで、生体内深部の可視化に挑戦した。我々はこれまでに、生物発光反応であるホタルルシフェリン・ルシフェラーゼ反応を基に、多種多様なルシフェリンアナログを有機合成することで、多くの構造活性相関を得てきた。これにより、イメージング材料であるアカルミネ(和光純薬工業)の開発に成功した。

アカルミネは、in vivo 光イメージング材料の主流であるホタルルシフェリンに比べ、高輝度であり、また動物実験でも有効な結果を得ている。しかし、アカルミネは難水溶性であるということから、動物実験の際に問題が生じている。基質濃度と輝度は比例関係にあるので、基質を高濃度で投与することが望ましいが、水溶性の低さによりこれが難しい。

そこで、アカルミネの構造を改変した新規ルシフェリンアナログを合成し、水溶性向上を目指した。今回、その実験結果の明細を報告する。

Imaging, Luciferin, in vivo

講演番号：2C14p03
講演日時：3 月 18 日 14:30～ C 校舎 14 会場

# ベラトリジンによる電位依存性ナトリウムチャネルの不活性化遅延作用に対するクランベシン B 類縁体の抑制効果

# Antagonistic activity of Crambescin B analogues against veratridine-induced delayed inactivation of voltage-sensitive sodium channel

○塚本 匡顕[1]、千葉 雪絵[1]、中崎 敦夫[2]、石川 裕生[2]、中根 嘉祈[2]、長 由扶子[1]、山下 まり[1]、西川 俊夫[2]、此木 敬一[1] ([1]東北大農、[2]名大農)
○Tadaaki Tsukamoto[1], Yukie Chiba[1], Atsuo Nakazaki[2], Yuki Ishikawa[2], Yoshiki Nakane[2], Yuko Cho[1], Mari Yamashita[1], Toshio Nishikawa[2], Keiichi Konoki[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Nagoya Univ.)

【目的】Crambescin A、B、C からなるクランベシン類は、地中海産海綿 *Crambe crambe* より単離された海洋天然物である。中崎らは、側鎖を持たない Crambescin B 誘導体（**Figure 1**）を合成し、Neuro 2A 細胞を用いた電位依存性ナトリウムチャネル（$Na_v$）阻害活性試験において、(+)-Crambescin B carboxylic acid が、テトロドトキシン（TTX）と同等の $Na_v$ 阻害活性を示すことを報告した。本研究では、ホールセルパッチクランプ実験により、$Na_v$ 各サブタイプに対する Crambescin B carboxylic acid の阻害活性を評価することを目的とした。

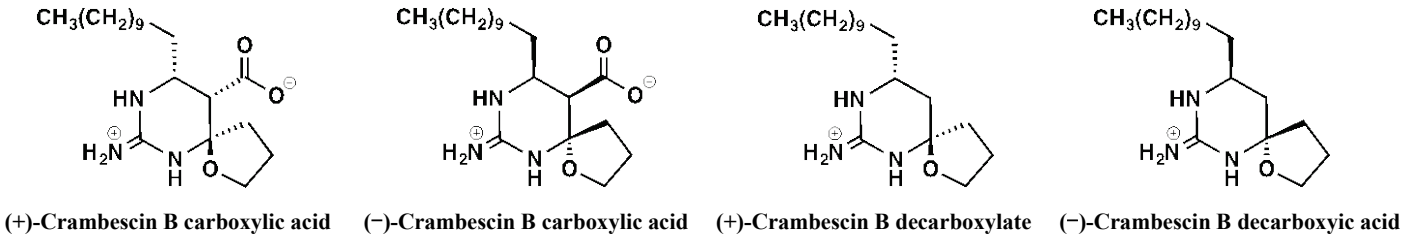



**Figure 1. Crambescin B 誘導体**

【実験方法】まず、マウス神経芽細胞 Neuro 2A を用い、Crambescin B carboxylic acid の $Na_v$ 阻害活性を評価した。続いて、Neuro 2A に発現する $Na_v1.2$ および $Na_v1.7$ をヒト胎児腎細胞 Hek293T に一過性発現させ、中崎らの報告に従い、Veratridine（VTD）存在下で、Crambescin B carboxylic acid の $Na_v$ 阻害活性を評価した。VTD は $Na_v$ の活性化電位を過分極側にシフトさせ、開孔を遅らせるため、ピーク電流の後に、持続電流および末尾電流が観測される（**Figure 2**）。この 3 つの電流に対して、Crambescin B carboxylic acid の光学活性体および脱炭酸体（**Figure 1**）が及ぼす効果を調べた。

【結果】Neuro 2A 細胞に対し、Crambescin B carboxylic acid は $Na_v$ 阻害活性を示さなかった。一方、Hek293T 細胞に一過性発現させた $Na_v1.2$、および $Na_v1.7$ に対して、ピーク電流は阻害しなかったが、VTD により惹起される持続電流および末尾電流を抑制した。また、Crambescin B carboxylic acid の光学異性体および脱炭酸体については、(+) 体の方が (−) 体よりも抑制作用が強く、脱炭酸体の方がカルボン酸体よりも強い結果が得られた。以上から、これら Crambescin B 誘導体は、VTD のアンタゴニストであることが示唆された。

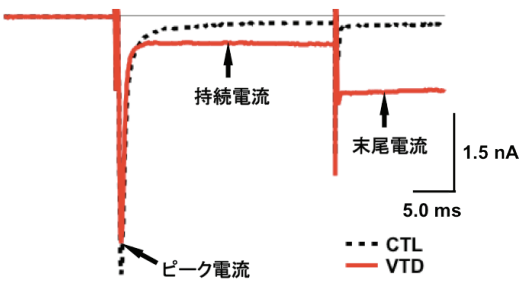



**Figure 2. $Na_v$ に対する VTD の作用**

【参考文献】Nakazaki *et al.*, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 5304.
Nakazaki *et al.*, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 53.

Voltage-sensitive sodium channel, Crambescin B, Veratridine

発表責任者：塚本匡顕（tadaaki.tukamoto.q4@dc.tohoku.ac.jp）

講演番号：2C14p04
講演日時：3 月 18 日 14:45～ C 校舎 14 会場

# 低分子生理活性化合物の新規な標的タンパク質同定法の開発
# New method to identify a target protein of a bioactive compound

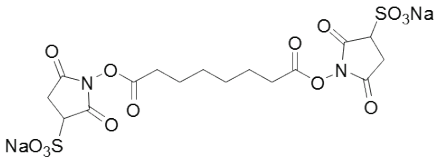
○穴吹 友亮、塚原 美宙、松浦 英幸、高橋 公咲（北大院農）
○Tomoaki Anabuki, Miu Tsukahara, Hideyuki Matuura, Kosaku Takahashi (Hokkaido Univ.)

## 研究背景）

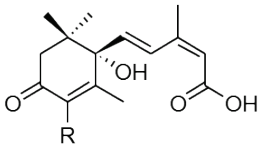
生理活性化合物の作用機序を解明する上で、その標的タンパク質の同定は不可欠である。標的タンパク質の同定に広く用いられている有用な手法として光アフィニティーラベル化法が挙げられる。この手法は生理活性化合物と標的タンパク質の物理的な相互作用を検出する手法であるが、生理活性化合物への光親和性標識基の導入により標的タンパク質との相互作用が損なわれる場合がある。この問題を克服するため、これまでの研究で、アジド基のみを導入した生理活性化合物を標的タンパク質と相互作用させた後に、クリック反応により光反応性標識基を導入するという標的タンパク質同定法の開発を行った（Anabuki T., et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., **80**, 432-439, 2016)。本研究では、光親和性標識基が担うクロスリンクの役割をタンパク質架橋剤に代替した新手法の開発に着手した。

## 方法・結果）

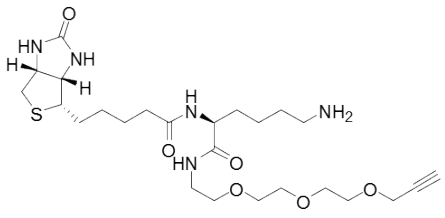
タンパク質架橋剤 BS3（**1**)は両端に活性エステル構造を有しており、アミノ基同士の架橋反応に用いられる試薬である。我々はこの性質に注目し、BS3 によりクロスリンクを行う新たな標的タンパク質同定法を設計した。新手法の有効性を確認するため、植物ホルモンの一種である ABA（**2**）とその受容体 PYL2 の相互作用の検出を試みた。まず、ABA にアジド基を導入した化合物であるアジドプローブ（**3**)、さらにビオチン、アルキンおよびアミノ基を有する化合物であるリンカー（**4**）を合成した。次に、組換え AtPYL2 を過剰発現させた大腸菌由来の粗タンパク質液とアジドプローブを相互作用させた。その後、リンカーを添加し銅触媒存在下でクリック反応により結合させた。最後に、BS3 を添加し、ウエスタンブロッティング法によりタンパク質の検出を試みたところ、AtPYL2 に由来するバンドが特異的に検出されたため、本手法が有効であると示された。さらに、タンパク質架橋剤を用いる新手法と光反応基を用いる従来の手法において、AtPYL2 に由来するバンドのシグナル強度を比較したところ、新手法を用いた場合のシグナル強度が有意に強かった。従って、タンパク質架橋剤を用いる新手法の検出感度の高さが示された。現在、シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）由来の粗タンパク質液を用いて AtPYL2 の検出を試みている。




1. BS3




2. ABA (R = H)
3. アジドプローブ (R = $N_3$)




4. リンカー

Target protein, Bioactive compound, Click reaction

講演番号：2C14p05
講演日時：3 月 18 日 15:00～ C 校舎 14 会場

# ゲノムワイド CRISPR/Cas9 ノックアウトライブラリーを用いた細胞毒性耐性遺伝子スクリーニングの試み

# Genome wide CRISPR/Cas9 knockout library revealed that squalene epoxidase is involved in malformin A1-resistance

○小泉 幸央[1]、福島 淳[2]、夏井 美幸[1]、門脇 歩美[1]、山口 智和[1]、今井 由美子[1]、久場 敬司[1]（[1]秋田大院医、[2]秋田県大生資科）
○Yukio KOIZUMI[1], Jun Fukushima[2], Miyuki Natsui[1], Ayumi Kadowaki[1], Tomokazu Yamaguchi[1], Yumiko Imai[1], Keiji Kuba[1] ([1]Akita Univ. Grad. Sch. Med, [2]Akita Pref. Univ. Fac. Bioresour. Sci.)

【目 的】糸状菌 *Aspergillus niger* が生産する分子内ジスルフィド結合を有する環状ペンタペプチド、マルホルミン A1（MA1）は植物に対する催奇形性物質として当初見出されたが、我々は血栓溶解を賦活化する低分子化合物の探索過程で本物質を再発見してきた[1)]。MA1 はウロキナーゼ発現細胞に作用し、プラスミン活性を増加させるが、詳細な作用機序は不明である[2)]。MA1 はウロキナーゼ発現細胞への作用と共に細胞毒性を示すが、これまでの構造活性相関研究の結果から血栓溶解賦活化と細胞毒性の分割の可能性が示されている。MA1 の細胞毒性を低下させる分子構造上の特性を理解するためには、毒性発現の作用機構を明らかとすることが重要である。今回、MA1 の細胞毒性に関わる遺伝子産物の同定を目的に、CRISPR/Cas9 ゲノム編集を活用したゲノムワイドノックアウトレンチウィルスライブラリーを用いて MA1 の細胞毒性に関与する遺伝子のスクリーニングを試みた。
【方 法】ライブラリーは Zhang らの 123,411 個の sgRNA を含む GeCKOv2（genome-scale CRISPR knockout）ライブラリーを用いた[3)]。スクリーニングは、レンチウイルス感染による遺伝子ノックアウトによって MA1 の細胞毒性に耐性化した U937 細胞を選択するポジティブセレクションにより行なった。耐性化により生存した細胞群のゲノムに組み込まれた sgRNA を増幅し、コントロール細胞との比較により濃縮された候補遺伝子を次世代シーケンサーで解析した。
【結果と考察】MA1 処理 14 日後に特定の遺伝子を標的とする多くの sgRNA の濃縮が確認された（3 倍以上：212、4 倍以上：29、5 倍以上：8）。このことは多くの遺伝子が MA1 毒性の耐性に関わっていることを示している。また、脂質代謝に関わる遺伝子を標的にした sgRNA が多く濃縮されており、脂質代謝に対する MA1 の影響が細胞毒性を誘発することが示唆された。候補遺伝子の一つ SQLE をレンチウイルス CRISPR/cas9 によりノックアウト誘導し、MA1 の細胞毒性を調べた結果、非感染細胞や Negative control 感染細胞に比べ MA1 に対する耐性化が確認された。また、SQLE 阻害剤 tolnaftate 存在下における MA1 の細胞毒性も調べた結果、MA1 の耐性化が確認された。以上の結果から、MA1 の細胞毒性には steroid 生合成が関与することが示された。また、細胞毒性物質の作用機序解析におけるゲノムワイド CRISPR/Cas9 ノックアウトシステムの有効性が示された。

1) Koizumi Y *et al*, *J Antibiot*, **55**, 78-82 (2002)
2) Koizumi Y *et al*, *Biol Pharm Bull*, **34**, 1426-1431 (2011)
3) Sanjana NE *et al*, *Nat Methods*, **11**, 783-784 (2014)

CRISPR/Cas9, malformin, squalene epoxidase

発表責任者：小泉幸央（ykoizumi@med.akita-u.ac.jp）

講演番号：2C14p06
講演日時：3 月 18 日 15:25～ C 校舎 14 会場

# アリインをモチーフとしたタンパク質修飾試薬の開発とその修飾機構の解明

# Development of Alliin motif protein modification reagent and elucidation of its modification mechanism

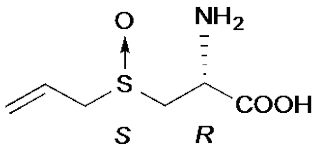
○武元 円[1]、谷本 夏[2]、袴田 航[1,2]、平野 貴子[2]、西尾 俊幸[1,2] ([1]日大院生資科、[2]日大生資科)
○ Madoka TAKEMOTO[1], Natsu TANIMOTO[2], Wataru HAKAMATA[1,2], Takako HIRANO[2], Toshiyuki NISHIO[1,2] ([1]Graduate School of Bioresource Sciencces, Nihon Univ., [2]Nihon Univ.)

アリイン（下図左）はニンニクの香気成分前駆体であり、酵素アリイナーゼにより分解され、分解物由来の分子が生体内の特定のタンパク質を修飾し生理活性を発現することが知られている。そこで我々は、アリインの二重結合部分を他の機能性分子に置換した分子がアリインと同様の機構でタンパク質を修飾し、タンパク質に様々な機能を付与できると考えた。本コンセプトに基づいて、アリインの二重結合を三重結合とした ALCSO（下図右）を設計した。アミノ酸誘導体である ALCSO は水に易溶であり、水溶液中でアリインと同様の機構でタンパク質を三重結合で修飾できると考えた。三重結合は生体内に無い官能基であり、アジド基を持つ化合物とクリック反応を行うことで簡便に様々な分子種をタンパク質に導入することができる。

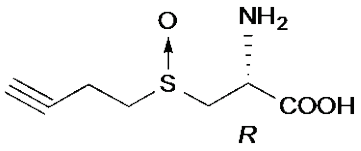
ALCSO の合成は、*L*-システインを出発原料として 4-Bromo-1-butyne を反応させ、システインのチオール基を選択的に CH≡C−$CH_2$−$CH_2$-S- とした後、硫黄原子を過酸化水素により=S(=O) に酸化し ALCSO を得た。総収率は 82.9%であった。

次に、合成した ALCSO を用いて、牛血清アルブミン（BSA）への三重結合の導入を試みた。100 mM リン酸 ナトリウム 緩衝液 (pH 7.0) に溶解した BSA と ALCSO を 24 時間、37℃で反応させ BSA へ三重結合を導入した。BSA への三重結合の導入の確認は、クリック反応により蛍光団およびビオチンをタンパク質へ導入し、SDS−PAGE を行った後に蛍光観察およびウェスタンブロッディングより確認を行った。その結果、両方法で BSA への三重結合の導入が確認された。このことから、ALCSO がタンパク質に三重結合を転移できることを明らかにした。

次に、ALCSO による BSA 修飾機構の解明を試みた。始めに、上記の三重結合導入 BSA をメルカプトエタノール処理し SDS−PAGE を行った。その結果、タンパク質上の蛍光が維持されたことから、ALCSO と BSA の結合が S-S 結合ではなく共有結合であることを確認した。そこで反応機構解析のために、ALCSO をのみを水中でインキュベートした。その結果、スルフェン酸中間体を経ることが示された。現在、ALCSO が反応するアミノ酸残基を決定するため、ALCSO と 20 種のアミノ酸との反応性を調べ、反応生成物の解析を行っている。



アリイン
From Garlic



ALCSO
For protein

protein modification, mechanism, Alliin

発表責任者：袴田航（hakamata.wataru@nihon-u.ac.jp）

講演番号：2C14p07
講演日時：3 月 18 日 15:40～ C 校舎 14 会場

抗腫瘍活性物質 vicenistatin 耐性に関与する遺伝子の同定
Identification of the gene responsible for the resistance of an antitumor compound, vicenistatin
○工藤 駿[1]、知念 拓実[1]、兼崎 友[2]、笠原 浩司[2]、工藤 史貴[3]、江口 正[3]、臼井 健郎[1]([1]筑波大生命環境科学、[2]東京農業大応用生物科学、[3]東京工業大理学院)
○Shun KUDO[1], Takumi CHINEN[1], Yu KANESAKI[2], Kouji KASAHARA[2], Fumitaka KUDO[3], Tadashi EGUCHI[3], Takeo USUI[1] ([1]University of Tsukuba, [2]Tokyo University of Agriculture, [3]Tokyo Institute of Technology)

**【背景・目的】**Vicenistatin は、放線菌 *Streptomyces halstedii* HC-34 が産生する抗腫瘍性の 20 員環マクロラクタムである[1)]。我々は本物質の動物細胞に対する作用を検討し、急速な液胞様構造を形成させること、またこの構造が初期エンドソーム由来であることを明らかにしてきた[2)]。さらに本物質は、既知の初期エンドソーム由来の液胞様構造を誘導する化合物の作用機序とは異なり、リン脂質の流動性を亢進するとともに、エンドソーム成熟を制御する Rab5-PAS 経路を活性化して異常な液胞化を誘導することが明らかとなっている[2)]。しかしながら、詳細な液胞形成機構や細胞増殖阻害機構は不明のままである。そこで本研究では出芽酵母を用いることにより、これらの機構を探ることを目的に研究を行った。

**【方法・結果】**出芽酵母 BY4741 由来の様々な薬剤感受性酵母を用いて vicenistatin 感受性を示す株を探索したところ、*erg6* 破壊株が vicenistatin に高い感受性を示すことを見出した。そこで、エルゴステロール合成系の各遺伝子を単独、あるいは二重破壊したところ、vicenistatin に耐性、または感受性を示す遺伝子破壊株が得られた。さらにこれらの感受性・耐性に関与する遺伝子は、エルゴステロール合成の酵素反応順とは無関係であった。これらの結果は、動物細胞の場合と同様、vicenistatin による膜流動性亢進が薬剤感受性に重要であることを強く示唆している。そこで次に、エルゴステロール合成系とは異なる感受性因子を探るため、*erg6* 破壊株を親株として vicenistatin 特異的耐性株の単離を試み、7 株の耐性株が得られた。これらの耐性変異株の変異遺伝子をゲノムシーケンスにより同定したところ、感受性に関わると考えられる複数の変異遺伝子が見出された。同定された耐性変異候補遺伝子の野生型を、それぞれの vicenistatin 耐性酵母に導入することで、3 つの vicenistatin 感受性に関わる遺伝子として、ステロール輸送関連遺伝子 2 つと、機能未知の遺伝子を同定した。現在これらの遺伝子産物の機能や他のタンパク質との相互作用について検討を行っているところであり、合わせて発表する予定である。

1) Shindo K *et al*, *J. Antibiot.*, **46**, 1076-1081 (1993)
2) Nishiyama Y *et al*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **80**, 902-910 (2016)

vicenistatin, vacuolation, ergosterol

講演番号：2C14p08
講演日時：3 月 18 日 15:55～ C 校舎 14 会場

# MA026 によるタイトジャンクション開口作用機構解析

# Analyses of the mechanism of tight junction opening by MA026

○山崎 洋平[1]、神田 祐輔[1]、志村 聡美[2]、紙透 伸治[2]、菅原 二三男[2]、南雲 陽子[1]、臼井 健郎[1] ([1]筑波大生命環境科学、[2]東京理科大理工学)
○ Yohei YAMASAKI[1], Yusuke KANDA[1], Stomi SHIMURA[2], Shinji KAMISUKI[2], Fumio SUGAEWARA[2], Yoko NAGUMO[1], Takeo USUI[1] ([1]University of Tsukuba, [2]Tokyo University of Science)

**【背景・目的】**シュードモナス属細菌 RtIB026 から単離された MA026 は、C 型肝炎ウイルス (HCV) に対し抗ウイルス活性を示す環状デプシペプチドである。近年、MA026 が HCV 受容体である claudin-1 に直接結合し、HCV の細胞内侵入を阻害することが報告された[1)]。Claudin-1 は HCV 受容体としての機能の他に、隣接する上皮細胞同士を強く接着することで細胞間の物質の自由な移動を妨げるバリア機能を果たしている tight junction (TJ)を構成する主要なタンパク質の一つであることが知られている。しかしながら MA026 が上皮細胞層のバリア機能へ与える影響は不明のままであった。そこで今回、MDCKII 細胞層の上皮バリア機能に対する MA026 の作用を検討した。

**【方法・結果】**MDCKII 細胞層のバリア機能に対する MA026 の作用を FITC-conjugated dextran-4 (FD4) の透過量、及び経上皮電気抵抗 (TER) により検討した。その結果、MA026 は FD4 の透過量を増加させるとともに、TER の急速な低下を引き起こすことが明らかとなった。これらの現象は、MA026 処理後、少なくとも 5 時間後までみられることから、MA026 は TJ を不可逆的に開口させることが示唆された。次に可逆的 TJ 開口物質である capsaicin の作用機構との比較を行った。Capsaicin は MDCKII 細胞内への $Ca^{2+}$ 流入を引き起こすことで、cofilin の活性化（脱リン酸化）と F-actin の局在変化を誘導することが明らかとなっている[2,3)]。そこで MDCKII 細胞内への $Ca^{2+}$ 流入、cofilin の活性化、及び F-アクチン局在に対する MA026 の作用を検討したところ、わずかに細胞内へ $Ca^{2+}$を流入させるものの、cofilin 脱リン酸化、及び F-actin の局在変化を示さなかった。以上の結果は、MA026 は claudin-1 を標的とする新規の不可逆的 TJ 開口物質であることを示している。

1) *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 18949-18956 (2013).
2) *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* **355**, 520-525 (2007)
3) *PLoS ONE,* 8, e79954 (2013)

MA026, Tight junction, Claudin-1

講演番号：2C14p09
講演日時：3 月 18 日 16:10～ C 校舎 14 会場

化合物アレイの新たな活用法：天然物の鏡像体化合物群の活用を目指したスクリーニング法の開発
Novel usage of chemical array: Screening approach for drug discovery from natural product enantiomers

○近藤 恭光[1]、野口 太朗[2]、大石 真也[2]、本田 香織[1]、大野 浩章[2]、藤井 信孝[2]、長田 裕之[1]([1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[2]京大院薬)
○Yasumitsu KONDOH[1], Taro NOGUCHI[2], Shinya OISHI[2], Kaori HONDA[1], Hiroaki OHNO[2], Nobutaka FUJII[2], Hiroyuki OSADA[1] ([1]Chem. Biol., RIKEN CSRS, [2]Grad. Sch. Pharm. Sci., Kyoto Univ.)

【目的】天然物及びその誘導体は、多様で魅力的な生物活性を示すものが多く、有用な医薬品探索のリソースである。天然物の鏡像体もまた、天然物と同等の化合物特性を有することから有用な医薬品探索のリソースとなり得るが、天然に存在しない鏡像体を有機合成してライブラリーを構築するには多大な労力を要することから、医薬品探索のリソースとしての活用は困難である。我々は、天然型タンパク質の鏡像体（D-タンパク質）を用いた評価系を構築し、これを用いて天然物ライブラリーをスクリーニングすることにより、天然物の鏡像体を化合物リソースとして活用できると考えた。本研究では標的タンパク質として腫瘍の増殖に関与する MDM2 を選択し、p53-MDM2 間のタンパク質間相互作用阻害剤を天然物鏡像体化合物群から探索することとした。
【方法と結果】Fmoc 固相合成法により L-MDM2（天然型タンパク質）及び D-MDM2（天然型タンパク質の鏡像体）を化学合成し、天然物を含む化合物ライブラリー(22,293 化合物)を用いて、化合物アレイにより D-MDM2 選択的に結合する化合物のスクリーニングを行った。続いて、蛍光偏光法により、D-p53-D-MDM2 間相互作用を阻害する化合物のスクリーニングを行った。その結果、D-MDM2 に対して、選択的に阻害活性を示した NP843 を見出した。NP843 の鏡像異性体(*ent*-NP843)を化学合成し、*ent*-NP843 が L-MDM2 に対する阻害活性を示すことを明らかにした。

1) Noguchi T, Oishi S, Honda K, Kondoh Y, Saito T, Kubo T, Kaneda M, Ohno H, Osada H, Fujii N. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **23**, 3802-3805 (2013).
2) Noguchi T, Oishi S, Honda K, Kondoh Y, Saito T, Ohno H, Osada H, Fujii N. *Chem. Commun.* **52**, 7653-7656 (2016).

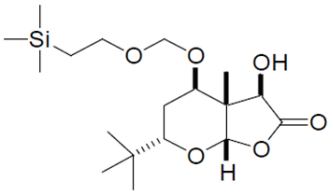
chemical array, MDM2, enantiomer

発表責任者：近藤恭光（ykondoh@riken.jp）

講演番号：2C14p10
講演日時：3 月 18 日 16:25～ C 校舎 14 会場

RK460 を基盤とした ABA 受容体選択的アンタゴニストの開発
Development of receptor selective abscisic acid antagonists based on RK460 structure
○由田 和津子[1]、三瓶 悠[2,4]、平井 剛[2,3]、伊藤 卓也[1]、近藤 恭光[1]、清水 猛[1]、長澤 和夫[4]、袖岡 幹子[2,3]、長田 裕之[1]([1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[2]理研 CSRS・有機合成、[3]理研 CSRS・触媒融合、[4]東農工大院・工)
○Kazuko YOSHIDA[1], Yu MIKAME[2,4], Go HIRAI[2,3], Takuya ITO[1], Yasumitsu KONDOH[1], Takeshi SHIMIZU[1], Kazuo NAGASAWA[4], Mikiko SODEOKA[2,3], Hiroyuki OSADA[1] ([1]Chem. Biol., RIKEN CSRS, [2]Synth. Org. Chem., RIKEN CSRS, [3]Cat. Integ. Res., RIKEN CSRS, [4]Grad. Sch. Fac. Eng., Tokyo Univ. of Agri. and Technol)

【背景と目的】



**RK460**

アブシジン酸（ABA）は、植物において乾燥や低温などにより合成される環境ストレス耐性を制御する植物ホルモンであり、気孔の開閉、遺伝子発現の誘導、種子休眠、さらに生長や免疫応答など幅広い生理機能に関与する。ABA シグナル伝達は、ABA がその受容体に結合することから開始されるが、ABA 受容体は植物に多重に存在し、シロイヌナズナにおいては 14 遺伝子（PYR1, PYL1-13）ありそれぞれの詳細な機能は未だ不明な点が多い。そこで、特定の受容体サブタイプに対して選択的なアゴニストまたはアンタゴニストを開発できれば、ABA の作用を細分化してシグナル伝達の詳細を明らかにすることができると考えられる。

当研究グループでは、理研 NPDepo ライブラリーより、ケミカルアレイスクリーニングを用いて ABA 受容体アンタゴニストを探索し、PYR1 を含む受容体サブタイプを標的とするアンタゴニスト RK460 を見出した（Ito et al., ChemBioChem 2015）。本研究では RK460 を基盤とした化合物展開によって、より効果的、もしくは異なる選択性を示すアンタゴニストの開発を目指す。

【方法と結果】

RK460 は 5 つの不斉炭素中心をもち、これらの立体化学が活性や選択性に重要であると予想される。6,5-シス縮環構造は化合物の安定性に重要と予想し、この部分以外の 3 つの不斉中心に関する立体異性体を合成し、活性評価を行った。アンタゴニスト活性は、シロイヌナズナ ABA 受容体のうち 9 種（PYR1, PYL1-5,9,10）の組み換えタンパク質および ABA と結合した受容体によって活性が阻害される脱リン酸化酵素タイプ 2C（PP2C）組み換えタンパク質を用いたホスファターゼアッセイにより評価した。その結果、立体異性体によって活性の強さと受容体選択性が異なっていた。活性の強かったものに関してさらに光学分割を行ったところ、これらの活性は主に一方のエナンチオマー由来であったことが明らかとなった。現在、これらの化合物の種子発芽への影響、および ABA 応答性遺伝子発現に対する影響についての検討を行っている。

本研究の一部は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業による支援を受けた。

abscisic acid, antagonist, chemical array

発表責任者：由田和津子（kazuko.yoshida@riken.jp）

講演番号：2C14p11
講演日時：3 月 18 日 16:50～ C 校舎 14 会場

# 形態変化スクリーニングによる新規抗真菌物質の探索

Exploration of novel antifungal substances based on cell morphological changes

○山本 甲斐、二村 友史、長田 裕之 (理研 CSRS・ケミカルバイオロジー研究グループ)
○Kai YAMAMOTO, Yushi FUTAMURA, Hiroyuki OSADA (Chem. Biol., RIKEN CSRS)

【目的】】真菌はヒトや農作物に感染し様々な病気や被害を引き起こす。既存薬には依然として安全性や選択性、菌の抵抗性といった問題があり、新薬の開発が強く求められている。本研究では真菌の形態変化に着目した独自のスクリーニング系を構築し、微生物代謝産物から新規抗真菌物質を発見することを目的とした。

【方法・結果】真菌は添加された化合物の作用によって様々な形態変化を示す。そこで作用と形態を対応づけたカタログがあれば新しい作用を有する抗真菌物質を効率良く発見することが出来ると考えた。我々はイネいもち病菌 *Pyricularia oryzae* (*P.o.*)に対して作用既知化合物が誘導する形態変化を網羅的に収集・分類したカタログを構築した。次に本カタログを用いたスクリーニングを実施した。まず 10 種類の土壌サンプルから単離した微生物約 79 種について、動物細胞、微生物、原虫に対する増殖阻害活性を評価した。その結果、放線菌株 YO15-A001 株の培養抽出液が *P.o.*に対し増殖阻害活性を示すことを見出した。形態変化カタログとの比較を行ったところ、呼吸鎖阻害剤が誘導する形態変化に類似の表現型を示した。そこで YO15-A001 が生産する活性物質の精製を試みた。培養液を各種クロマトグラフィーにより精製し、活性物質 YO15001-1 を単離した。構造解析の結果、YO15001-1 は oligomycin 様の骨格を有する 26 員環マクロライド化合物であることが明らかとなった。

【結論】形態変化データベースを用いたスクリーニングにより、土壌単離放線菌 YO15-A001 株から 26 員環マクロライド化合物を単離した。本化合物は呼吸鎖阻害作用を有する oligomycin と構造が類似しており、また誘導する表現型も類似することを確認した。これら結果から、真菌において形態変化を指標に作用機序を推測することは可能であり、構築したスクリーニング系の有効性を確認した。

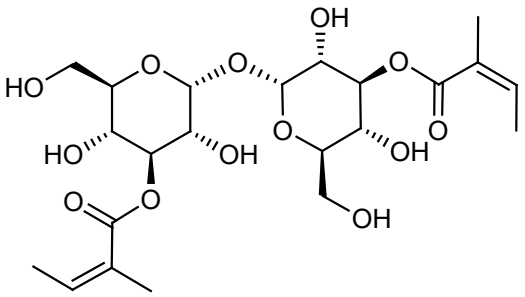
antifungal substance, microbial origin, morphology

講演番号：2C14p12
講演日時：3 月 18 日 17:05～ C 校舎 14 会場

# 新規トレハロース誘導体“トレハンジェリン A”は Sirt1 活性化を介しオートファジーを誘導する
# A Novel Trehalose Derivative "Trehangelin A" Induces Autophagy via Activation of Sirt1

○小坂 邦男[1]、曽田 匡洋[1]、田中 麻美[1]、中島 琢自[2]、稲橋 佑起[2]、高橋 洋子[2]、大村 智[2]([1]長瀬産業（株）、[2]北里大学北里生命科学研究所)
○Kunio KOSAKA[1], Masahiro SOTA[1], Mami TANAKA[1], Takuji NAKASHIMA[2], Yuki INAHASHI[2], Yoko TAKAHASHI[2], Satoshi OMURA[2] ([1]NAGASE & CO. Ltd., [2]Kitasato Univ. Institute for Life Sci)

トレハンジェリン A［trehangelin A: TgA］は,北里大北里生命研がキンギンソウの根から得た放線菌 *Polymorphospora rubra*_K07-0510 株の培養液から見出した新規化合物であり,トレハロースの 3, 3’位の水酸基に分岐鎖不飽和脂肪酸（アンジェリカ酸）がエステル結合したトレハロース誘導体である．これまでに（１）光線過敏症抑制作用,（２）コラーゲンやエラスチン産生促進作用,（３）炎症や老化に関わる因子である CYR61 発現を抑制する作用が報告されている.今回,皮膚細胞に対する TgA の効果について検討を行った結果，TgA にサーチュイン１（Sirt1）活性化及びオートファジー誘導作用があることを見出したので報告する.




【方法】TgA は,発酵法により産生させカラム分離精製することによって得た.表皮細胞株（HaCaT）に TgA を添加し，Sirt1 のターゲットである p53 とヒストン H3 のアセチル化レベル及び AMPK リン酸化レベル,またオートファジーマーカーである LC3-II レベルに与える影響をイムノブロッティング法で測定した．更に定量性 PCR によって,乾癬などを引き起こす炎症性サイトカインを添加した時におこる遺伝子発現変化に対し TgA が与える影響について調べた.

【結果・考察】TgA は少なくとも 50mg/mL まで毒性を示さず,極めて毒性の低い化合物であることが示唆された．TgA によって AMPK のリン酸化は亢進され，ヒストン H3 や p53 のアセチル化レベルは著しく低下した．一方，LC3-II の形成は増大した．これらの効果は Sirt1 ノックダウンにより強く抑制されたことから，TgA によって Sirt1 活性化がおこり，それを介してオートファジーが誘導されたことが示唆された． Sirt1 の活性化やオートファジーの誘導は炎症性疾患の抑制につながることが報告されている．そこで，炎症性サイトカインによる遺伝子発現変動に対する TgA の影響をみたところ，TgA によって炎症性サイトカイン誘導フィラグリン発現低下は著しく抑制され、その効果は Sirt1 ノックダウンで低下した．以上の結果より，TgA は Sirt1 を活性化し，オートファジーを誘導することにより，炎症性皮膚疾患抑制作用を発揮することが期待される.

trehangelin, sirtuin, autophagy

発表責任者：小坂邦男（kunio.kosaka@nagase.co.jp）

講演番号：2C14p13
講演日時：3 月 18 日 17:20～ C 校舎 14 会場

shRNA スクリーニング法の改良による化合物の標的経路の同定の効率化
Identification of target pathways of compounds by modified shRNA screening

○高瀬 翔平[1,2]、黒川 留美[3]、新井 大祐[4]、中尾 洋一[4]、久城 哲夫[2]、松本 健[1,3,5]、吉田 稔[1,3,5] ([1]理研 CSRS・ケミカルゲノミクス、[2]明治大院・農、[3]理研・化学遺伝学、[4]早稲田大院・先進理工、[5]理研 CSRS・創薬シード)
○Shohei Takase[1,2], Rumi Kurokawa[3], Daisuke Arai[4], Yoichi Nakao[4], tetsuo Kushiro[2], Ken Matsumoto[1,3,5], Minoru Yoshida[1,3,5] ([1]Chem. Genomics Res. Group, RIKEN CSRS, [2]Grad. Sch. of Agri., Meiji Univ., [3]Chem. Genet. Lab., RIKEN, [4]Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [5]Seed Cpds Explor. Unit Drug Discov., RIKEN CSRS)

生理活性物質の標的経路または標的タンパク質を同定することは非常に意義ある研究分野であり、創薬研究においても欠かせない領域である。作用点が特定された化合物は、ケミカルバイオロジー的手法の中心であるバイオプローブとしての利用も期待できる。しかし、天然有機化合物のような生理活性物質の標的は 1 つであるとは限らず、その複数存在する標的を一挙に同定することは困難とされている。そこで、本研究はプール型 shRNA ライブラリーと次世代シークエンサーを用いたゲノムワイドな RNAi スクリーニングを行うことによって、一挙に生理活性物質の標的となる分子を特定し、さらには合成致死因子の特定することを目的とした。

我々はまず、本研究手法のスループットを向上させるため、次世代シークエンサーで一度に複数のサンプルを解析できる系の開発を試みた。各サンプル間の区別をするためにシークエンス前の PCR 操作においてインデックスタグを付加したプライマーを使用することによって、これまでの 4 倍のサンプル数を同時に解析でき、再現性および定量性のある手法を確立した。標的既知の化合物 2 種類（etoposide、spliceostatin A）に対して shRNA ライブラリースクリーニングを行い、この手法を用いて直接的な標的や作用機構に関わる分子を特定することに成功した。

次に、プロヒビチンと結合し、ミトコンドリアを介したアポトーシスを誘導することが知られている海洋天然物 aurilide のアナログ aurilide B に対して shRNA ライブラリースクリーニングを行い、合成致死因子を探索した。その結果、$Na^+/K^+$ ATPase のαサブユニットの 1 つである ATP1A1 のノックダウンが aurilide B に対する感受性を亢進させることがわかった。さらに、$Na^+/K^+$ ATPase 阻害剤として知られる ouabain との併用処理でも感受性の亢進が確認された。

以上より、バイアスのない網羅的な shRNA ライブラリースクリーニングは生理活性物質の作用機構解析に対して強力な手法の 1 つであり、新たな生物学的知見の取得につながることが期待される。また、本研究でスループットの向上した shRNA ライブラリースクリーニング法は細胞株や化合物のプロファイリングを容易にし、標的未知な生理活性物質の標的探索や治療標的遺伝子の特定に役立つことが期待される。

chemical biology, shRNA screening, Na+/K+ ATPase

講演番号：2C14p14
講演日時：3 月 18 日 17:35～ C 校舎 14 会場

ChemProteoBase を用いた MTH1 阻害剤の作用解析
Analysis of the effect of MTH inhibitors by ChemProteoBase profiling
○室井 誠、川谷 誠、河村 達郎、近藤 恭光、二村 友史、田中 美帆、青野 晴美、本田 香織、長田 裕之（理研 CSRS・ケミカルバイオロジー）
○Makoto Muroi, Makoto Kawatani, Tatsuro Kawamura, Yasumitsu Kondoh, Yushi Futamura, Miho Tanaka, Harumi Aono, Kaori Honda, Hiroyuki Osada (Chem. Biol., RIKEN CSRS)

【目的】我々は、２次元電気泳動に基づくプロテオーム解析法を用いた薬剤作用解析システム ChemProteoBase を構築してきた。ChemProteoBase は 2-D DIGE を用いて薬剤処理 HeLa 細胞のプロテオーム解析を行い、296 スポットの発現量を既知薬剤と比較し、薬剤標的を推測するシステムである。ChemProteoBase を用いて、BNS-22(Top II 阻害剤)、Pyrrolizilactone(Proteasome 阻害剤), NPD6689(tubulin 阻害剤)などの標的同定に用いてきたほか、細胞内での化合物の作用の確認や、作用の新規性を確かめるために ChemProteoBase を利用してきた。一方、MTH１タンパク質は酸化されたヌクレオチドを還元する酵素で、幾つかのがん細胞で過剰発現していることが知られており、近年、MTH1 阻害剤が抗がん剤の候補として注目を集めている。我々は、新規 MTH１阻害剤の探索を行い、選択的な MTH1 阻害剤を取得し、得られた阻害剤について ChemProteoBase を用いて作用比較を行った。
【方法・結果】新規 MTH1 阻害剤を見出すために、化合物アレイを用いて、RIKEN NPDepo ライブラリ 29,809 化合物に対してスクリーニングを行った。酵素アッセイを行い、有効な MTH1 拮抗阻害剤 NPD7155, NPD9948 を得た。これらの２化合物は低濃度で MTH1 の酵素活性を示すが、HeLa 細胞の増殖は弱い阻害活性しか見出されず、既知の MTH1 阻害剤とは傾向が異なった。そこで、NPD7155、NPD9948 と既知の MTH1 阻害剤 TH287, (S)-crizotinib, SCH51344 の細胞増殖に及ぼす阻害作用の解析を、ChemProteoBase を用いて解析を行った。NPD7155、NPD9948 は高い類似度を示し、camptothecin や SCH51344 ともクラスターを形成した。一方、(S)-crizotinib や TH287 はこれらの化合物とはクラスターを形成しなかった。また、最も低濃度で MTH1 の酵素阻害活性を有する TH287 はチューブリン阻害剤を含むクラスターにクラスタリングされた。そこで、TH287 と、より安定である誘導体である TH588 のチューブリンの重合に及ぼす作用検討したところ、濃度依存的に阻害活性が認められた。また、TH287、TH588 処理細胞では、チューブリン重合阻害剤で認められる、Bcl-2 のリン酸化や細胞周期の G2/M 期阻害が認められた。MTH1 の過剰発現株、並びに、siRNA を用いたノックダウン株を用いて解析から、MTH1 阻害では HeLa 細胞の増殖阻害は認められなかった。これらの結果から、TH287、TH588 の細胞増殖阻害作用の要因はチューブリンの阻害によるものと考えられる。酵素阻害活性によるスクリーニング系の場合、得られた化合物が本来の標的以外のオフターゲットを持つ可能性があり、生体内での作用を検討するためには、細胞系を用いて検討することは重要である。ChemProteoBase 解析は化合物のオンターゲット解析のみならずオフターゲット解析でも有効であると考えられる。

ChemProteoBase, Target identification, MTH1 inhibitor

講演番号：2C14p15
講演日時：3 月 18 日 17:50～ C 校舎 14 会場

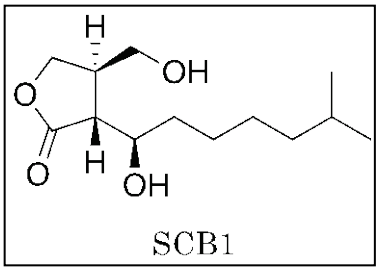
# 耐熱性放線菌の熱ショックによる微生物ホルモン生産誘導

# Induction of bacterial hormone production by heat shock in thermotolerant streptomyces

○齋藤 駿[1]、加藤 航[1]、勝山 陽平[2]、大西 康夫[2]、井本 正哉[1] ([1]慶大院・理工、[2]東大院・農生科)
○Shun SAITO[1], Wataru KATO[1], Yohei KATSUYAMA[2], Yasuo OHNISHI[2], Masaya IMOTO[1] ([1]Keio Univ., [2]Tokyo Univ.)

［背景・目的］ 放線菌には多くの二次代謝生合成遺伝子が存在するにも関わらず、その多くが休眠状態にあるため新規化合物獲得の障壁となっている。そのため、近年そのような休眠状態の二次代謝生合成遺伝子の覚醒化技術が報告されているが、本質的な「覚醒化制御機構」についての理解は進んでいない。そこで我々は、このような二次代謝覚醒化制御機構の一端を解析することを目的として、「耐熱性微生物」の存在に着目した。耐熱性微生物とは、常温菌であるにも関わらず、本来の生育温度よりも 10-15℃高い温度でも生育する微生物である。そのため、常温菌である放線菌の中にも耐熱性を示す放線菌（耐熱性放線菌）が存在し、培養温度を常温から高温(45℃)へとシフトさせることで、高温培養選択的に休眠状態の二次代謝生合成遺伝子が覚醒するのではないかと考えた。

［結果・考察］ これまで、in house の放線菌ライブラリー3,040 株から寒天培地上で高温（45℃）でも生育可能な放線菌を探索した結果、90 株が再現性良く生育することを確認した。次に、これら耐熱性放線菌を 30℃および 45℃で 5 日間液体培養し、得られたそれぞれの 1-BuOH 抽出物に対して LC/MS を用いた差異解析を行った。その結果、多くの耐熱性放線菌において高温培養選択的に生産される代謝物を見出し、これらを熱ショック代謝物（Heat Shock Metabolites(HSM)）と命名した。そこで、まずはじめに耐熱性放線菌 AY2 株が生産する HSM の同定を試みた。各種クロマトグラフィーを駆使し、NMR によるスペクトル解析を行った結果、AY2 株が生産する HSM の一つとして「微生物ホルモン」の一種として知られる SCB1 を同定した。SCB1 は通常“μg/L スケール”でしか生産されないが、AY2 株では 4.5 L の培養液中に約 3 mg（mg/L スケール）も生産していた。微生物ホルモンは、①放線菌の形態分化・胞子形成、②種々の抗生物質生産、を誘導するシグナル分子として知られている。したがって、「耐熱性の獲得」や高温培養による物質生産の「トリガー分子」として機能している可能性が考えられる。実際に、AY2 株では SCB1 以外にも高温培養選択的にいくつかの HSM の生産が誘導されていた。現在、これらの HSM の同定を試みるとともに、AY2 株における SCB1 大量生産機構の解明および SCB1 が本当に微生物ホルモンとして機能しているかどうかの検証に取り組んでいる。



SCB1

Thermotolerant streptomyces, Heat shock metabolites, Bacterial hormone

発表責任者：井本正哉（imoto@bio.keio.ac.jp）

講演番号：2C14p16
講演日時：3 月 18 日 18:05～ C 校舎 14 会場

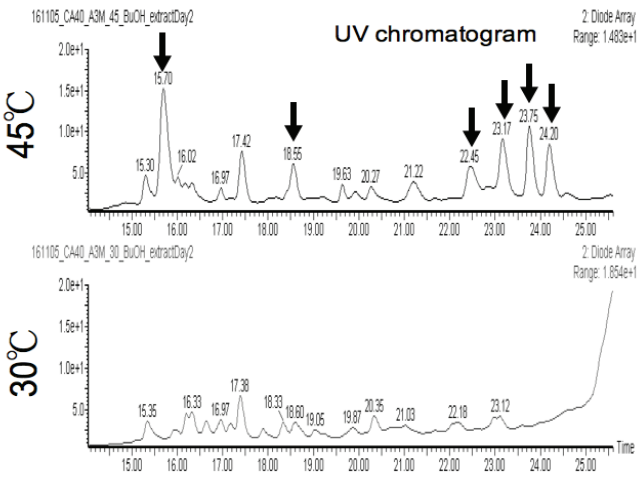
# 耐熱性放線菌の熱ショック代謝物(HSM)の生産

# Production of heat shock metabolites (HSM) in thermotolerant streptomyces

○加藤 航、齋藤 駿、井本 正哉（慶應大理工）
○Wataru KATO, Syun SAITO, Masaya IMOTO (Keio Univ.)

［背景・目的］　放線菌はこれまで、多様な構造と多彩な生理活性を有する二次代謝産物を多数生産し、これらの中から疾患の治療薬などの多くの生理活性物質が開発されてきた。近年のゲノム解析技術の進展により、一株の放線菌には約 30 個もの二次代謝産物生合成遺伝子群が存在することが明らかとなったが、その多くは休眠状態にあると考えられている。そのため、これらの生合成遺伝子群を効率的に活性化する手法の開発が求められている。そこで我々が着目したのが常温よりも 10～15℃高い温度条件でも生育する”耐熱性放線菌”である。耐熱性放線菌 AY2 株が高温培養選択的に二次代謝産物の生産を誘導することで知られる微生物ホルモン SCB1 を生産することを見出した。このことから高温培養により放線菌に熱ショックを与えることで、二次代謝産物生合成経路の覚醒および撹乱が誘発されることが示唆された。本研究では耐熱性放線菌から高温培養選択的化合物群を網羅的に検出し、それらの同定・データベース化を行うことを目的とする。

［方法・結果］　寒天培地上において通常の 30℃培養で生育する 3040 種の放線菌のうち、90 種が高温(45℃)で生育することを確認した。耐熱性放線菌を高温(45℃)と通常の 30℃で培養し、培養生産物を LC-MS を用い比較したところ、45℃培養選択的に生産が検出される化合物群があることを見出した(右図)。我々はこの高温培養選択的に生産される二次代謝産物のことを Heat Shock Metabolites(HSM)と名付けた。これらの耐熱性放線菌のうちランダムに選択した 9 株に対し 3 種類の液体培地を用い 30℃及び 45℃培養を行った。その結果、常温培養では放線菌の増殖は培養 5 日目まで対数関数的であるのに対し、高温培養においては放線菌の増殖が培養後 2,3 日目をピークに、その後減少することを見出した。また、各培養液の n-BuOH 抽出物を LC-MS により分析し、それぞれの培地での HSM 生産の有無を解析した。その結果、多くの HSM は培養 2 日後にその生産が検出されたが、培養日数に依存性を示す HSM も存在した。上記の培養条件により他の耐熱性放線菌についても同様の方法で解析を進めている。




Thermotolerant streptomyces, Heat shock metabolites

発表責任者：井本正哉（imoto@bio.keio.ac.jp）

講演番号：2C15a01
講演日時：3 月 18 日 09:20～ C 校舎 15 会場

# パラセントロンの全合成研究：アレン結合を有するエンドグループの合成

# The total synthesis of Paracentrone：synthesis of end-group incruding an allene bond

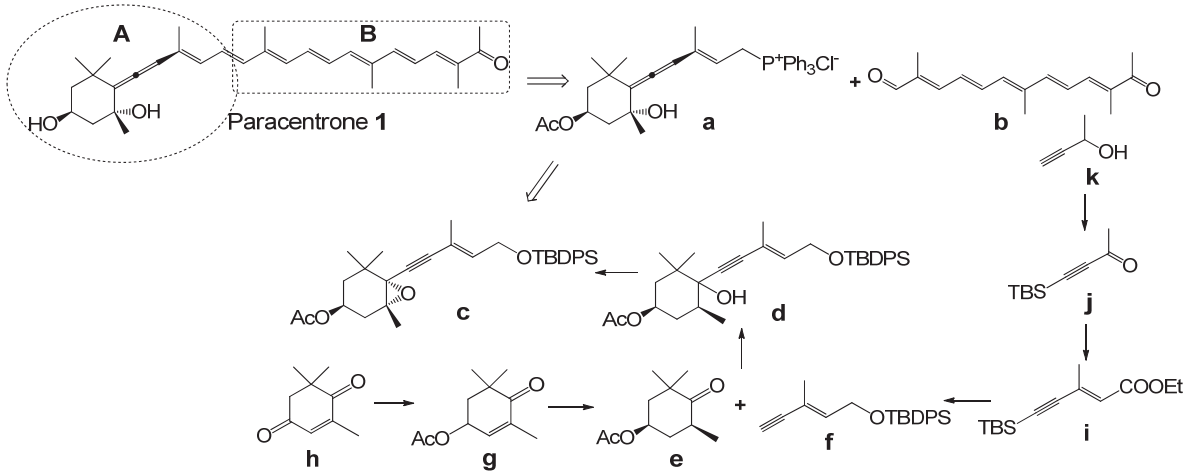
○兼山 大輝、藤丸 和美、濱田 昌弘、岸本 崇生、中島 範行（富山県大工）
○Daiki KANEYAMA, Kazumi FUJIMARU, Masahiro HAMADA, Takao KISHIMOTO, Noriyuki NAKAJIMA (Toyama Pref. Univ.)

【目的】

フコキサンチンは、天然におけるカロテノイドで最も多いとされる。他のカロテノイドと異なり抗肥満作用、抗糖尿病作用が報告されており、その合成については多くの報告がある。フコキサンチンの代謝物の一つであるパラセントロン（**1**）は天然にはほとんど存在しないため、その活性は測定できていない。そこで、**1** とその類縁体の構造-活性相関を視野に入れた活性試験に充分量の合成を計画した。

【方法・結果】

本研究ではパラセントロンをエンドグループ（**A**）とポリエン部（**B**）に分け、それらをカップリングする方法で全合成を目指した。2,6,6-Trimethyl-2-cyclohexene-1,4-dione（**h**）の選択的還元、水添によって **e** を合成した。アレンの形成に必要なアセチレンを末端に有する三置換(*E*)-オレフィン（**f**）は、3-butyn-2-ol（**k**）の酸化、続く Wittig 反応によって合成した。これら二つのユニットをカップリングさせ、化合物 **d** を経て **c** に導いた。現在、**a** 及び **b** の合成についても検討中である。




【参考文献】

[1] J. A. Haugan. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1.* 1997, 18, 2731-2737
[2] Y. Murakami, M. Nakano, T. Shimofusa, N. Furuichi, S. Katsumura. *Org. Biomol. Chem.*, 2005, 3, 1372-1374

organic synthesis, carotenoid, stereoselectivity

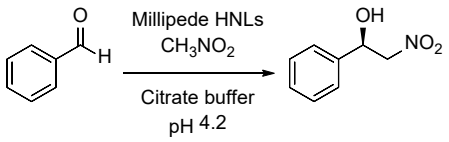
講演番号：2C15a02
講演日時：3 月 18 日 09:35～ C 校舎 15 会場

# Application of hydroxynitrile lyase from millipede in asymmetric Henry reaction

○Daijun Zheng, Yasuhisa Asano (Toyama. Pref. Univ)

**[Introduction]**

Henry reaction is C-C bond forming reaction between nitroalkanes and aldehydes or ketones to produce *β*-nitroalchohols, which are utilized as synthetic chiral building blocks. The first biocatalytic Henry reaction was discovered by using *S*-hydroxynitrile lyase (HNL) from *Hevea brasiliensis* (*Hb*HNL) by Griengl's group (1). Our group also achieved (*R*)-*β*-nitroalchohols synthesis using an *R*-HNL from *Arabidopsis thaliana* (*At*HNL) (2). In these cases, the reactions were performed in aqueous-organic biphasic system to inhibit the strong background reaction. Recently, our group discovered novel HNLs from millipedes, having excellent specific activity for (*R*)-mandelonitrile synthesis and stability. Therefore, we applied them to Henry reaction in the water phase without organic solvent.




**[Methods and Results]**

Millipede HNLs (ChuaHNL from *Chamberlinius hualienensis* (3), NtmHNL from *Nedyopus tambanus mangaesinus*, OgraHNL from *Oxidus gracilis*, and PlamHNL from *Parafontaria laminate*) could catalyze Henry reaction in the water phase. Since they had excellent specific activity and stability at a low pH region, the Henry reaction can be performed at low pH and the background reaction was suppressed. When 200 U ChuaHNL was incubated with 25 mM benzaldehyde and $CH_3NO_2$ (56 eq) in 1 mL of 400 mM citrate buffer, pH 4.2, at 30ºC for 9 h, 12.3 mM (*R*)-2-nitro-1-phenylethanol was synthesized (49% yield, 92% ee). When the other three HNLs were used under the same conditions, the following results were obtained (OgraHNL 26% yield, 64% ee; NtmHNL 15% yield, 39% ee; PlamHNL 16% yield, 47% ee). Among them, ChuaHNL showed the highest specific activity for synthesis (*R*)-2-nitro-1-phenylethanol.

We succeeded in the Henry reaction with ChuaHNL at high enantiomeric excess without using organic solvent. This is a new enzymatic method for production of *β*-nitroalchohol, and the new reaction contributes to simplify the reaction.

(1) T. Purkarthofer, *et al*. *Angew. Chem. Int. Ed*., **45**, 3454-3456 (2006).
(2) K. Fuhshuku, and Y. Asano. *J. Biotechnol.*, **153**, 153-159 (2011).
(3) M. Dadashipour, Y. Ishida, K. Yamamoto, *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 10605-10610 (2015).

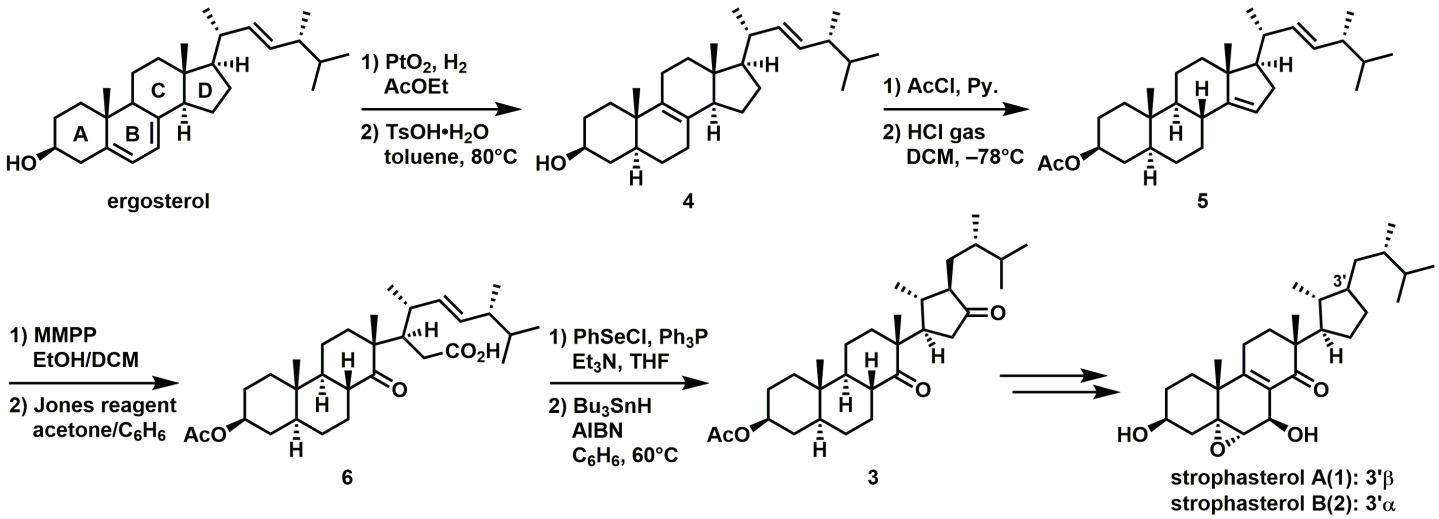
hydroxynitrile lyase, Henry reaction, millipedes

講演番号：2C15a03
講演日時：3 月 18 日 09:50～ C 校舎 15 会場

StrophasterolA 及び B の全合成研究－その 1
Synthetic studies on StrophasterolA and B - part 1
○福田 裕紀、佐藤 俊太郎、小倉 由資、桑原 重文（東北大院農）
○Yuki FUKUDA, Shuntaro SATO, Yusuke OGURA, Shigefumi KUWAHARA (Tohoku Univ.)

【目的】Strophasterol A(**1**)及び B(**2**)は、食用キノコであるサケツバタケ(*Stropharia rugosoannulata*)から単離・構造決定されたステロイド類であるが、ステロイドとしては前例のない位置にシクロペンタン環を有している [1,2]。**1** は小胞体ストレス誘導神経細胞死抑制活性及び抗 MRSA 活性に加えて、複数種のキノコ菌糸体に対して子実体形成誘導活性を示したことから、キノコ界初のホルモンである可能性を秘めている。我々は **1** 及び **2** の量的供給を実現して、より詳細な活性評価を行うことを目的として **1** 及び **2** の全合成研究に着手した。本発表では、共通鍵中間体 **3** の効率的合成法の開発について述べる。

【結果】比較的安価なステロイド原料である ergosterol を接触水素化と酸による異性化により **4** へと導いた。続いてステロイド A 環の水酸基をアセチル化した後、塩化水素ガスを作用させることで、D 環部に二重結合が移動した **5** を高収率で得た。**5** を MMPP によるエポキシ化とクロム酸酸化による D 環の開裂によりカルボン酸 **6** とした。**6** をセレノエステル体へと変換した後にラジカル環化を行って、strophasterol 類に特徴的な 5 員環構造をもつ共通鍵中間体 **3** を合成した。



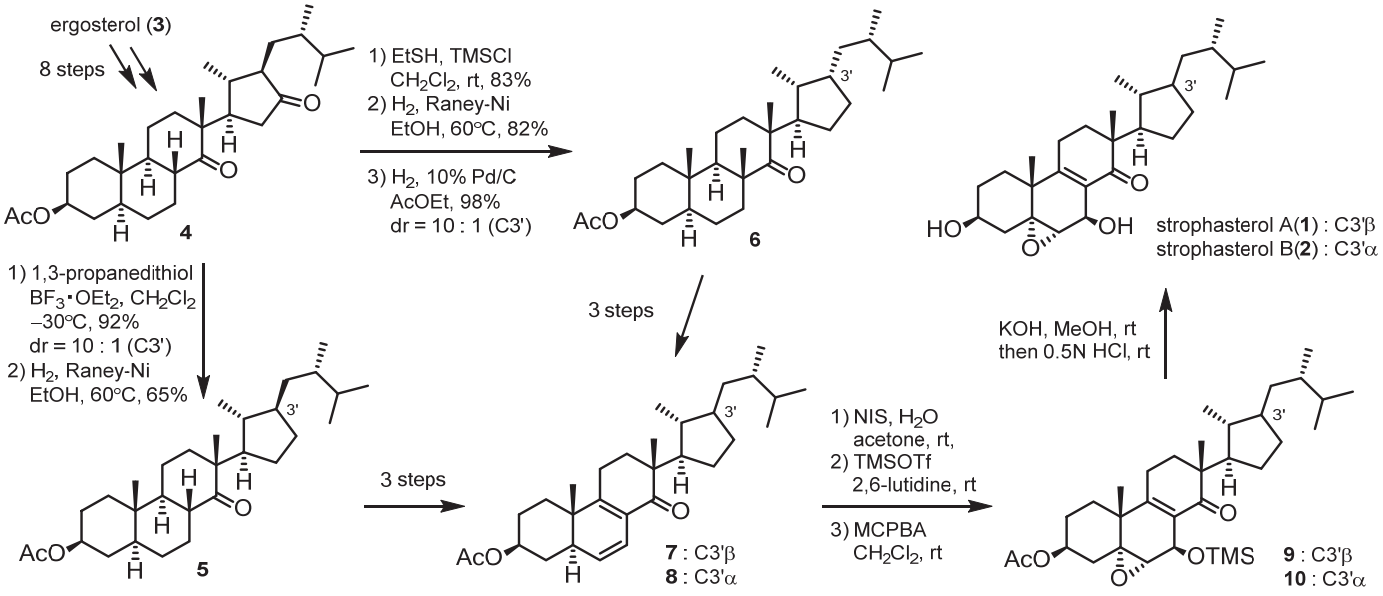

1)Kawagishi, H. *et al., Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10820-10822.
2)Kawagishi, H. *et al., Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2013**, *77*, 1779.

total synthesis, strophasterol, mushroom

講演番号：2C15a04
講演日時：3 月 18 日 10:05～ C 校舎 15 会場

StrophasterolA 及び B の全合成研究－その 2
Synthetic studies on StrophasterolA and B - part 2
○佐藤 俊太郎、福田 裕紀、小倉 由資、桑原 重文（東北大農）
○SHUNTARO SATO, Yuki Fukuda, Yusuke Ogura, Shigefumi Kuwahara (Tohoku Univ.)

【目的】strophasterol A(**1**)及び B(**2**)は、食用キノコであるサケツバタケ(*Stropharia rugosoannulata*)から 単離・構造決定されたステロイド類であり、複数種のキノコ菌糸体に対して子実体形成誘導活性を示す[1,2]。我々は **1** 及び **2** の量的供給を実現して、より詳細な活性評価を行うことを目的として **1** 及び **2** の全合成研究に着手した。本発表では、共通鍵中間体 **4** から **1** 及び **2** の全合成について述べる。
【結果】ergosterol(**3**)より 8 工程を経て導いた **4** に対し、5 員環上のケトンを位置選択的にチオアセタール化した後に脱硫反応を行うことで **5** を得た。一方、**4** を位置選択的にビニルチオエーテルへと変換した後に、脱硫反応と二重結合に対する水素添加を行うことで **6** を高立体選択的に得た。**5** 及び **6** は 3 工程を経てジエン **7** 及び **8** へと導くことができた。続いて **7**、**8** をヨードヒドリンへと変換した後に、生じた 2 級水酸基を TMS 基で保護した。得られた化合物に対し MCPBA を作用させることで次亜ヨウ素酸の脱離とエポキシ化が一挙に進行し、所望の立体化学を有する **9**、**10** を合成することに成功した。最後に Ac 基と TMS 基の脱保護を行い、**3** から 17 工程で **1** 及び **2** の全合成を達成した。




1)Kawagishi, H. et al., Angew. Chem. Int. Ed. 2012, 51, 10820-10822.
2)Kawagishi, H. et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 2013, 77, 1779.

total synthesis, strophasterol, mushroom

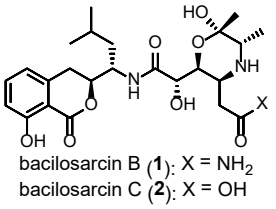
発表責任者：佐藤俊太郎（agky-84-tennisyunta@hotmail.co.jp）

講演番号：2C15a05
講演日時：3 月 18 日 10:20～ C 校舎 15 会場

# バシロサルシンBおよびCの合成

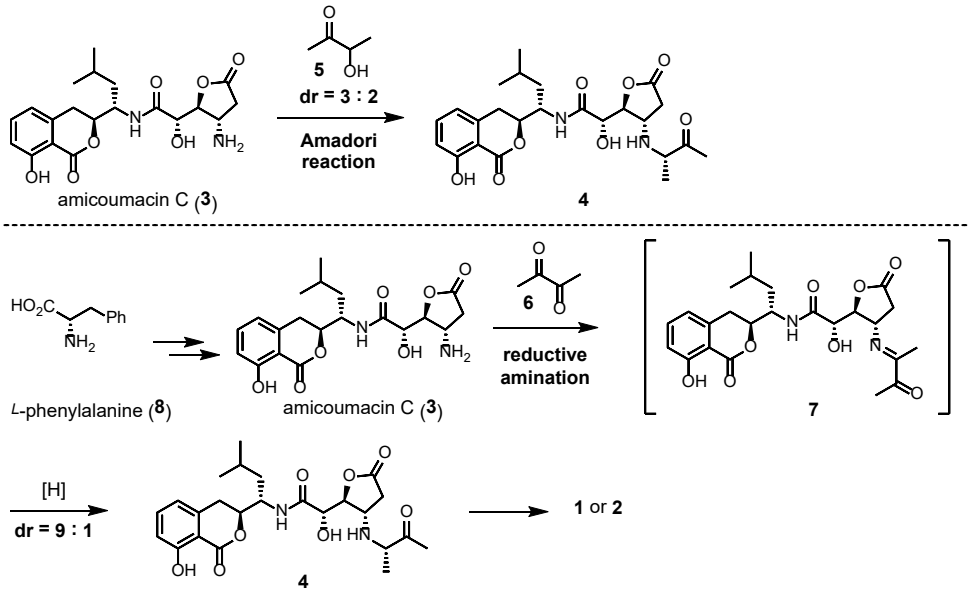
# Synthesis of bacilosarcins B and C

○倉沢 一輝、桑原 重文、榎本 賢（東北大農）
○Kazuki Kurasawa, Shigefumi Kuwahara, Masaru Enomoto (Tohoku Univ.)




【目的】アミノイソクマリン型天然物は、左側のジヒドロイソクマリン構造を共通部位として各種異常アミノ酸由来の構造が連結した化合物群である。多くの類縁体が単離・構造決定されており、多種多様な生物活性をしめす魅力的な化合物群であることが知られている。その中でも、バシロサルシンB (**1**) および C (**2**)は、それぞれ *Bacillus subtilis* から単離・構造決定されたアミノイソクマリン型天然物であり、共に天然物としては珍しい 2-ヒドロキシモルホリン構造を有している [1, 2]。この興味深い構造から過去に当研究室で **1** の全合成が達成された [3]。しかし、合成終盤のアミクマシン C (**3**)に対するジアステレオ選択的ブタノン単位導入に改善の余地が残されていた。そこで本研究では、**4** のジアステレオ選択的合成による、**1** の改良合成と **2** の初の全合成を目指した。

【方法・結果】鍵となる **4** の合成に関しては、過去に **3** とアセトイン(**5**)とのアマドリ反応を用いた際に、わずかながらジアステレオ選択的に **4** が得られたことに着目し [3]、反応中間体の安定配座を利用したジアステレオ選択的合成法を考案した。すなわち、**3** とジアセチル(**6**)との反応で生じるイミン **7** の安定配座を考慮すれば還元的アミノ化により、ジアステレオ選択的に **4** が合成できるものと考えた。まず基質となる **3** は、当研究室で開発された第二世代合成を基に、*L*−フェニルアラニン(**8**)から 13 工程で合成した [4]。続いて、考案した還元的アミノ化を実際に行ったところ、予想通り **3** に対してジアステレオ選択的にブタノン単位が導入され、**4** の合成に成功した。最後に、**4** に対する加アンモニア分解で **1** の改良合成を、加水分解で **2** の初の全合成をそれぞれ達成した。




1) Y. Igarashi *et al.*, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 6420. 2) P.-Y. Qian *et al.*, *Marine Drugs* **2012**, *10*, 319.
3) M. Enomoto and S. Kuwahara, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1144.
4) T. Suzuki, T. Nagasawa, M. Enomoto and S. Kuwahara, *Tetrahedron* **2015**, *71*, 1992.

total synthesis, bacilosarcin, reductive amination

講演番号：2C15a06
講演日時：3 月 18 日 10:45～ C 校舎 15 会場

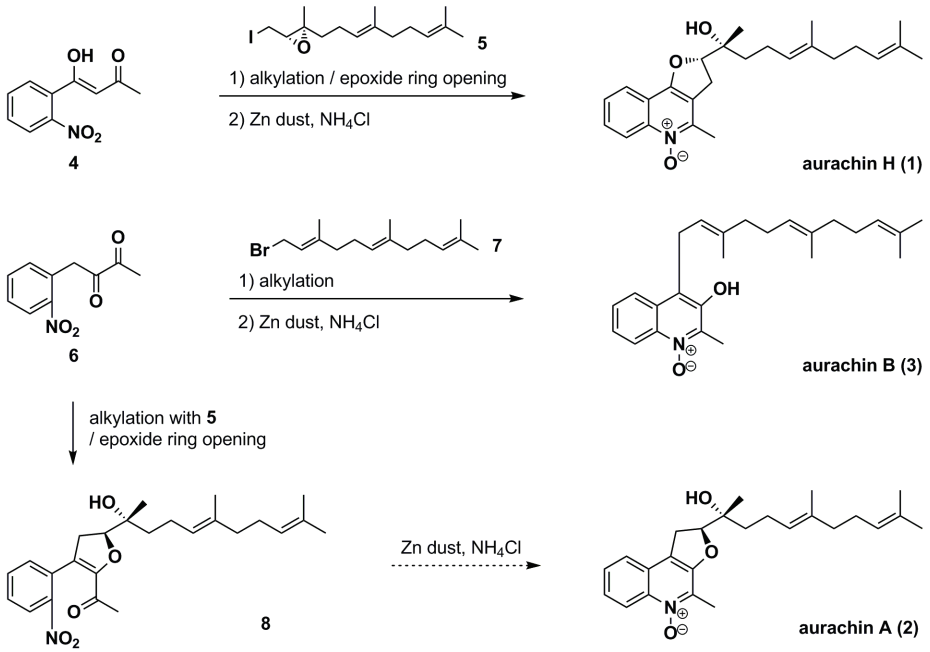
# Aurachin 類の合成研究

# Synthetic Study of Aurachins A, B and H

○高橋 和暉、桑原 重文、榎本 賢（東北大農）
○Kazuki TAKAHASHI, Shigefumi KUWAHARA, Masaru ENOMOTO (Tohoku Univ.)

【目的】aurachin H (**1**), A (**2**)および B (**3**)は Höfle らによって *Stigmatella aurantiaca* から単離されたキノリンアルカロイドであるが、**2** はその絶対立体配置が報告されていなかった[1,2]。また、**2** および **3** のキノリン-*N*-オキシド部位が電子伝達系を阻害することで抗菌活性を示すと考えられているのに対し、同様の部分構造を持つ **1** は未だ活性が知られていない。そこで **1**,**2** および **3** を合成するとともに、**2** の構造決定と **1** の活性試験を行うことにした。

【方法・結果】2014 年、榎本らは類縁体の合成において亜鉛粉末を用いたニトロ基の還元と続くオキシムの形成によりキノリン-*N*-オキシド構造の構築に成功している[3]。本手法に倣い、既知物質 **4** とアルキルヨージド **5** とのアルキル化およびエポキシドの開環を経て、亜鉛粉末で還元することで **1** の全合成を達成した。一方、ジケトン **6** をアリルブロミド **7** とのアルキル化後に亜鉛粉末で還元することで **3** の全合成を達成した。現在まで **2** の合成に向け **6** と **5** とのアルキル化および続くエポキシドの開環により **8** の調製に成功している。**2** の合成を達成次第、比旋光度の比較により絶対立体配置を決定する予定である。




1) B. Kunze, G. Höfle and H. Reichenbach, *J. Antibiot.* 1984, *37*, 454.
2) G. Höfle and B. Kunze, *J. Nat. Prod.* 2008, *71*, 1843.
3) M. Enomoto, W. Kitagawa, Y. Yasutake and H. Shimizu *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2014, *78*, 1324.

total synthesis, heterocyclic compound, alkaloid

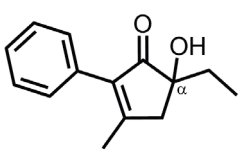
発表責任者：高橋和暉（takahashik@dc.tohoku.ac.jp）

講演番号：2C15a07
講演日時：3 月 18 日 11:00～ C 校舎 15 会場

# 好熱性細菌が生産する ktedonoketone 光学活性体の合成研究

# Synthetic study of ktedonoketone

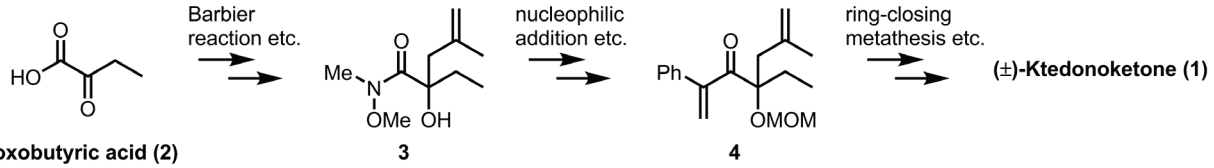
○石井 紗也加、桑原 重文、榎本 賢（東北大農）
○Sayaka ISHII, Shigefumi KUWAHARA, Masaru ENOMOTO (Tohoku Univ.)

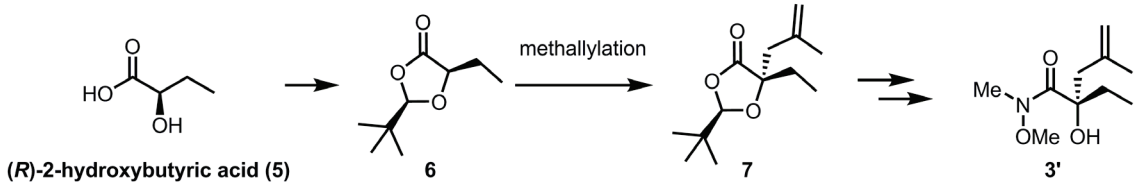


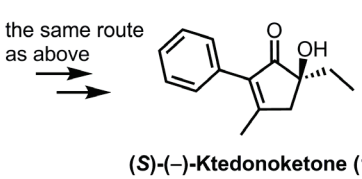
**(+)-Ktedonoketone (1)**

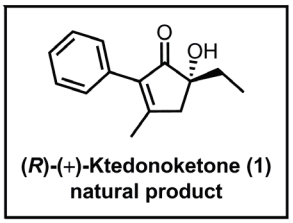
【背景・目的】好熱性細菌 *Thermosporothrix hazakensis* は、放線菌に類似した高い二次代謝能と大きなゲノムサイズを有する細菌であることから、新たな生物活性天然物が単離される可能性を秘めている。(+)-Ktedonoketone (**1**)は *T. hazakensis* の培養液より単離・構造決定された新規化合物だが、十分な量が生産されなかったために、生物活性は未だ解明されておらず、α 位第 3 級アルコールの絶対立体配置も未決定である [1]。本研究では、絶対立体配置の決定、および生物活性解明に向けた標品供給を目的として、合成研究に着手した。

【方法・結果】合成経路の確立のため、初めにラセミ体の合成を行うことにし、2-oxobutyric acid (**2**) から鍵中間体 **3** を経由して、6 工程で(**±**)-**1** の合成を達成した。続いて、光学活性体 **1'**の合成に取りかかった。出発原料(*R*)-2-hydroxybutyric acid (**5**)に pivalaldehyde を作用させて Seebach lactone (**6**)とし [2]、これに対して不斉メタリル化 [3]を行うことによって、**7** を調製した。その後、光学活性な鍵中間体である **3'**を経由して、ラセミ体と同様の経路で光学活性体である(*S*)-ktedonoketone (**1'**)の全合成を達成した。比旋光度を測定したところ、負の値を示した。天然物は正の値を示すことから、絶対立体配置は合成したものとは逆の *R* 体であることが示唆された。




1) Master thesis (Toyama Prefectural University)
2) *Heterocycles*, **2001**, *72*, 255.
3) *Eur. J. Org. Chem.*, **2005**, 2965.

total synthesis, Ktedonoketone, *Thermosporothrix hazakensis*

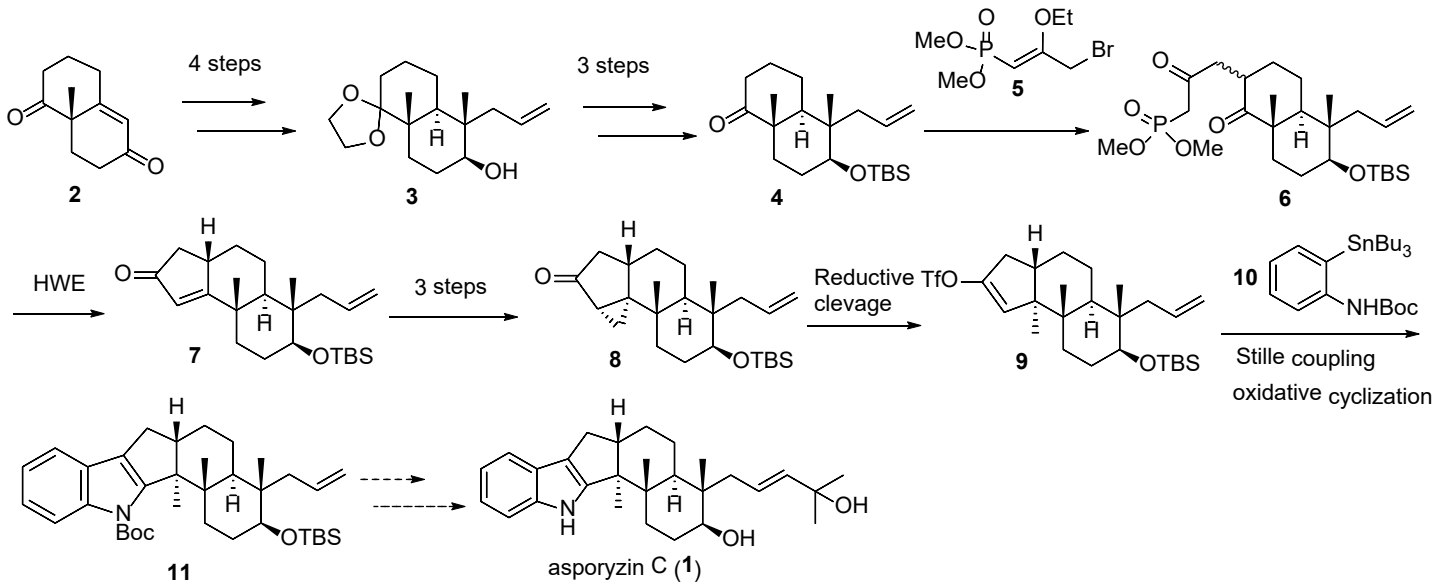
講演番号：2C15a08
講演日時：3 月 18 日 11:15～ C 校舎 15 会場

asporyzin C の全合成研究
Synthetic study of asporyzin C
○室川 哲郎、榎本 賢、小倉 由資、桑原 重文（東北大院農）
○Tetsuro Murokawa, Masaru Enomoto, Yusuke Ogura, Shigefumi Kuwahara (Tohoku Univ.)

【目的】インドールジテルペン類は主に糸状菌が生産する化合物群であり、様々な生物活性を有する。本研究では、当研究室で見出した合成ルートをさらに発展させたインドール環含有共通中間体の効率的合成法の開発を試み、その方法を基盤として、殺虫活性を有する asporyzin C (**1**) をはじめとする類縁体の全合成達成を目的とした。

【方法・結果】

始めに Wieland-Miesher ketone (**2**) から既知の工程により **3** へと導き、さらに水酸基の保護等を含む 3 工程の変換により **4** とした。続いて別途調製した **5** と連結して **6** を得た後、分子内 Horner-Wadsworth-Emmons 反応を行って **7** へ導き、さらに Simmons-Smith シクロプロパン化等を経て **8** を調製した。**8** のシクロプロパン環を還元的に開裂し、生じたエノラートを Commins 試薬で捕捉することで **9** を得た。続いて別途調製した **10** とのカップリング、Pd 試薬を用いた酸化的環化反応により **11** を得ることに成功した。現在、**11** に至る工程の効率化及び **11** 右側の変換による各種類縁体の合成について検討している。




1）M. –F. Qiao *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20. 5677-5680.

total synthesis, indole diterpenes

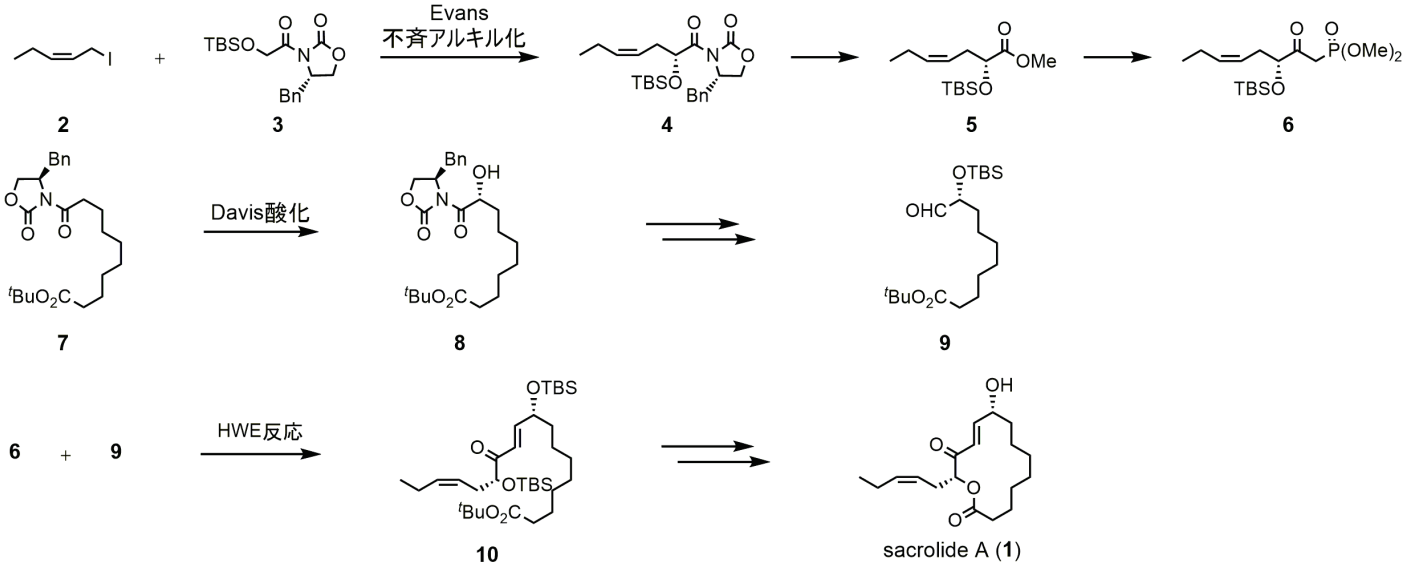
講演番号：2C15a09
講演日時：3 月 18 日 11:30～ C 校舎 15 会場

# Sacrolide A の全合成
# Total synthesis of Sacrolide A

○毛利 朋世、十和田 諒、小倉 由資、桑原 重文（東北大農）
○Tomoyo MOHRI, Ryo TOWADA, Yusuke OGURA, Shigefumi KUWAHARA (Tohoku Univ.)

【目的】Sacrolide A(**1**)は 2014 年に富山県立大学の五十嵐らによりシアノバクテリア（*Aphanothece sacrum*)から単離・構造決定された化合物である。本化合物がオキシリピンとしては珍しい 14 員環マクロライド構造を持つことに加え、抗菌・抗真菌活性および細胞毒性を有することに興味を持ち[1)]、**1** の全合成を目的として研究に着手した。

【結果】**1** が有する 2 つの不斉中心は、オキサゾリジノンを不斉補助基として用いることで導入することにした。まずα-シリルオキシアセチル基を有する **3** に対する Evans 不斉アルキル化により、**4** を単一異性体として得た。続いてメチルエステル **5** へと変換し、さらにホスホネート **6** へと導いた。一方、*t*-Bu エステル **7** に対して Davis 酸化を行うことで、アミドカルボニル基の α 位に立体選択的に水酸基を導入し、その後数工程の変換を経てアルデヒド **9** を得た。次にホスホネート **6** とアルデヒド **9** の両フラグメントを HWE 反応によって連結し、所望のエノン **10** を *E*-選択的に合成した。さらに *t*-Bu 基および TBS 基の脱保護を行い、最終工程におけるマクロラクトン化によって **1** の全合成を達成した。




1) Y. Igarashi, *et al.*, *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 1808.

total synthesis, natural products chemistry, macrolide

講演番号：2C15a10
講演日時：3 月 18 日 11:45～ C 校舎 15 会場

(2*S*,3*R*,4*R*)-3,4-dihydroxyarginine の合成と一酸化窒素合成酵素の阻害活性
Synthesis of (2*S*,3*R*,4*R*)-3,4-dihydroxyarginine and its inhibitory activity against nitric oxide synthase

○増田 裕一[1,2]、丸山 千登勢[3]、川畑 球一[3]、濱野 吉十[3]、土井 隆行[2] ([1]三重大生物資源、[2]東北大薬、[3]福井県大生物資源)
○Yuichi MASUDA[1,2], Chitose MARUYAMA[3], Kyuichi KAWABATA[3], Yoshimitsu HAMANO[3], Takayuki DOI[2] ([1]Mie Univ., [2]Tohoku Univ., [3]Fukui Pref. Univ.)

**【背景と目的】**放線菌が生産する抗生物質 streptothricin (ST)（図 A）は、原核・真核生物の両方に対して毒性を示すため、臨床利用されていない。濱野らは、遺伝子変異により得られた ST 類縁体が原核生物特異的に抗菌活性を示すことを報告し[1]、遺伝子改変技術を用いた新規 ST 類縁体の開発を進めている。その実現のためには、ST 生合成酵素の機能の詳細な解明が不可欠である。これまで、ST 生合成酵素の一つである ORF12 が、L-arginine を (2*S*,3*R*,4*R*)-3,4-dihydroxyarginine (**1**) （図 B）に変換することを明らかにしている[2]。酵素合成により得られた **1** の絶対立体配置の決定は、有機合成した標品との分析データの比較により行った。本発表では、**1** の有機合成法について紹介する。また、L-arginine 類縁体には一酸化窒素合成酵素（NOS）を阻害するものが多く報告されているので、**1** の NOS 阻害活性を評価した。

**【方法と結果】**Boc-L-vinylglycine-O*t*Bu (**2**) と Fmoc-allylamine (**3**) を Hoveyda-Grubbs 触媒を用いたクロスメタセシスに附すことにより、E 体のアルケン **4** を合成した。続いて、酸化オスミウムを用いた 1,2-ジオール化を行うことで、3*R*,4*R* の水酸基 2 つを構築した。Fmoc 基を除去し、生じたアミンに Goodman 試薬を作用させることでグアニジル基を導入した後、全ての保護基を除去することで **1** の合成を達成した[3]。**1** をマウスマクロファージ様細胞株 RAW264 に添加し、NO 産生量を Griess 法により評価したところ、活性は強くないものの、**1** は NO 産生を有意に抑制した[3]。

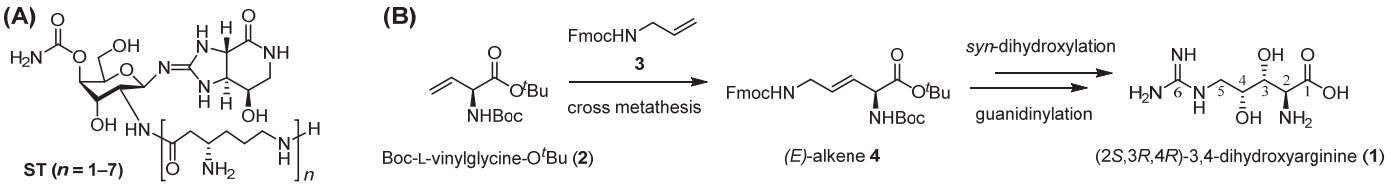



**図** (A) ST の化学構造，(B) (2*S*,3*R*,4*R*)-3,4-dihydroxyarginine (**1**) の合成スキーム．

**【引用文献】**

1) Hamano, Y.; Matsuura, N.; Kitamura, M.; Takagi, H. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 16842.
2) 丸山 千登勢，本山 賢人，馬場 信行，川畑 球一，泉川 美穂，増田 裕一，小松 護，土井 隆行，新家 一男，池田 治生，濱野 吉十：抗生物質ストレプトスリシン生合成機構の解明，農芸化学会 2014 年度大会，講演番号 2A04p05.
3) Masuda, Y.; Maruyama, C.; Kawabata, K.; Hamano, Y.; Doi, T. *Tetrahedron*, **2016**, *72*, 5602.

arginine, streptothricin, nitric oxide synthase

発表責任者：増田　裕一（masuda@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：2C15p01
講演日時：3 月 18 日 14:00～ C 校舎 15 会場

# トウモロコシ (*Zea mays*) に対するビール酵母由来の多糖による根の生育促進活性

# Effects of beer yeast polysaccharide on the root growth enhancement of *Zeamays*

○廣實 康博[1]、中道 貴也[1]、吉永 直子[1]、北川 隆徳[2]、高崎 智子[2]、御影 佳孝[2]、新開 茂樹[3]、小林 優[1]、宮下 正弘[1]、森 直樹[1] ([1]京大院農、[2]アサヒグループホールディングス株式会社、[3]東果大阪株式会社)

○Yasuhiro HIROZANE[1], Takaya NAKAMICHI[1], Naoko YOSHINAGA[1], Takanori KITAGAWA[2], Satoko TAKASAKI[2], Yoshitaka MIKAGE[2], Shigeki SHINKAI[3], Masaru KOBAYASHI[1], Masahiro MIYASHITA[1], Naoki MORI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Asahi Group Holdings,Ltd., [3]Toka Osaka Co.,LTD)

[背景と目的]

近年，多糖類の植物生育促進効果が報告されている．例えばイネでは chitosan や海藻由来の多糖である alginate で処理を行うことで収量が増加する．さらに多糖類によって防御応答が引き起こされ耐病性が向上することが知られている．また我々は，β-1,3/1,6-glucan 及びリン，カリウムを含むビール酵母細胞壁由来の資材 (以下 CW1) をイネ (*Oryza sativa*) に処理すると IAA 濃度が増え，根張りが向上することが明らかにし，昨年の大会で報告した．本研究では CW1 がトウモロコシ (*Zea mays*) に与える影響について明らかにするため，生物試験法の確立及び植物体中成分の分析を行った．

[方法と結果]

2 日間発芽処理を行ったトウモロコシ (LG3520) の種子を CW1 を添加した溶液中で 1 週間水耕栽培した．根の乾燥重量を処理区とコントロールで比較したところ，処理区で有意に増加した．

CW1 に含まれる活性本体を絞り込むため透析実験を行った．CW1 を 3 日間透析 (MWCO = 500-1000 D) し，透析膜内の残存液 (以下内液) と透析膜外の水溶液 (以下外液) に分離し，各々を前述と同等に調整した後生物試験に供した．その結果内液処理個体はコントロールと変わらなかったのに対し，外液処理個体は CW1 処理個体と同じく根張りの向上効果が確認された．内液及び外液に含まれるリンを定量したところ，CW1 中に添加されているリンはほぼ全量が外液に含まれていた．同様にカリウムも外液に滲出したと考えられ，これら無機元素の吸収及び利用がトウモロコシにおける活性発現の一端を担っている可能性も検討した．

トウモロコシをアセトンで抽出し，インドール-3-酢酸 (以下 IAA) を LC/MS/MS で定量した．植物体中の IAA 濃度と根の生育促進効果との関連について考察する．

maize, polysaccharide, root growth

講演番号：2C15p02
講演日時：3 月 18 日 14:15～ C 校舎 15 会場

植物病原菌に対するイネフィトアレキシンの抗菌活性
Antifungal activity of rice phytoalexins against plant pathogens
○勝間田 駿、大橋 佳奈、戸嶋 浩明、長谷川 守文（茨城大農）
○Shun KATSUMATA, Kana OHASHI, Hiroaki TOSHIMA, Morifumi HASEGAWA (Ibaraki Univ.)

【目的】
植物の病害抵抗性機構の一つとして抗菌性化合物であるフィトアレキシンの蓄積が挙げられる。主要作物であるイネにおいては、重大な被害をもたらす病原菌であるイネいもち病菌に抗菌活性を持つフィトアレキシンが現在までに 19 種類報告されている。また、最近イネのフィトアレキシンとして報告されたアミド化合物であるベンゾイルトリプタミンとシナモイルトリプタミンはイネいもち病菌のほか、イネごま葉枯病菌に対しても抗菌活性を持つことが示されている。一方、病原菌が植物の抵抗性を回避するためにフィトアレキシンを代謝・解毒する場合があり、これまでにイネのジテルペン系フィトアレキシンであるモミラクトン A およびフラボノイド系フィトアレキシンであるサクラネチンがイネいもち病菌によって代謝されることが明らかになっている。本研究では、イネいもち病菌と並んで重要な病原菌とされるイネごま葉枯病菌・イネ紋枯病菌に対するフィトアレキシンの抗菌活性評価を行い、病原菌によるフィトアレキシン代謝活性に関しても調べた。
【方法・結果】
抗菌活性を評価するためには比較的多量の化合物を必要とするため、本研究では籾殻から容易に単離できるモミラクトン A と容易に化学合成できるサクラネチン、ベンゾイルトリプタミン、シナモイルトリプタミンを評価対象とした。病原菌に対する抗菌活性は、ポテトデキストロース寒天培地上における菌糸体増殖阻害活性によって評価した。イネごま葉枯病菌に対してはモミラクトン A を除く 3 化合物で抗菌活性（最も活性が強かったサクラネチンでは 300 μM で 33% の増殖阻害）が見られ、イネ紋枯病菌に対しては全ての化合物で抗菌活性（最も活性が強かったモミラクトン A では 300 μM で 41% の増殖阻害）が見られた。また、病原菌によるフィトアレキシンの代謝に関してはポテトデキストロース液体培地に各化合物を添加し、各化合物の経時的変化を LC/MS/MS で定量した。その結果、4 種のフィトアレキシンすべてがごま葉枯病菌と紋枯病菌によって代謝されていることが分かった。さらに、紋枯病菌によるサクラネチンの解毒代謝産物の一つとしてサクラネチンの生合成前駆体でもあるナリンゲニンを同定した。
また、イネを宿主としないいもち病菌に対するイネフィトアレキシンの抗菌活性と代謝活性についても発表予定である。

phytoalexin, antifungal activity, rice

発表責任者：長谷川守文（morifumi.hasegawa.1@vc.ibaraki.ac.jp）

講演番号：2C15p03
講演日時：3 月 18 日 14:30～ C 校舎 15 会場

# 海藻由来の抗菌・抗真菌物質の探索

Investigation of antibacterial and antifungal substances derived from seaweed

○新毛 実結、山本 歩、金子 賢介（八戸高専）
○Miyu SHINKE, Ayumi YAMAMOTO, Kensuke KANEKO (NIT, Hachinohe College)

［目的］

生物由来の天然化合物は様々な生理活性を有しており、生分解性・化学構造的多様性の観点から有用である。青森県沿岸は豊富な海藻資源が存在するが、食用に適さず未利用のものが多い。そこで本研究では青森県沿岸に生息する海藻の有効利用について検討することを目的とし、海藻由来の抗菌・抗真菌物質の探索を行った。

［方法］

青森県八戸市種差海岸から採集した各種海藻より有機成分の抽出を行った。得られた酢酸エチル画分をエタノールに溶解し、大腸菌(NBRC3972)、クロコウジカビ(NBRC105649)、アオカビ(NBRC6352)に対する抗菌・抗真菌活性をペーパーディスク法にて評価した。また、TLC による成分分析を行った。

［結果］

得られた酢酸エチル画分のうちフジマツモに大腸菌、ミツデソゾに大腸菌、クロコウジカビ、アオカビに対する抗菌・抗真菌活性が確認された。

また、TLC による成分分析の結果、これらの活性を示したフジマツモ、ミツデソゾには他の海藻類で観察されていない特徴的なスポットが確認されたことから、本スポットに含まれる成分が抗菌・抗真菌活性に寄与している可能性が示唆された。

（本研究は科研費若手（B）16K18754 および国立高等専門学校機構研究プロジェクトの支援のもと遂行されました）

seaweed extract, antibacterial activity, antifungal activity

講演番号：2C15p04
講演日時：3 月 18 日 14:45～ C 校舎 15 会場

# 抗真菌性シクロデプシペプチド，W493 A の全合成

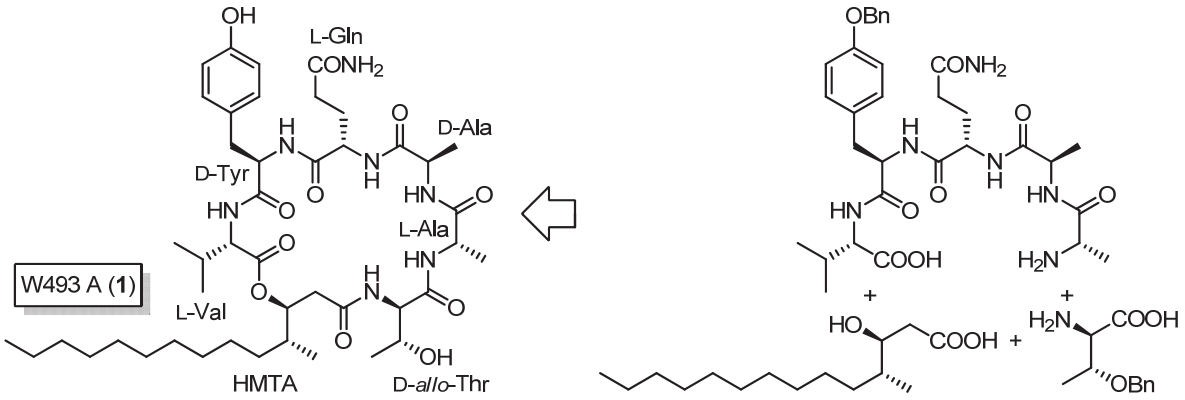
# Total synthesis of W493 A, an antifungal cyclodepsipeptide

○三井 美彩、太田 裕太郎、附田 裕也、高森 啓介、二瓶 賢一（宇都宮大農）
○Misa MITSUI, Yutarou OOTA, Yuya TUKUDA, Keisuke TAKAMORI, Ken-ichi NIHEI (Faculty of Agriculture, Utsunomiya University)

*Fusarium* sp.の培養液から単離・構造決定されたシクロデプシペプチド，W493 A(**1**)は抗真菌活性を有しており，特にイネごま葉枯れ病菌の *Cochliobolus miyabeanus* の菌糸に対して，形態異常を誘導する．このような形態異常は，真菌の細胞壁や細胞膜に化合物が特異的に作用する際に観察される．したがって，**1** は生物選択性の高い農薬の開発リード分子に位置づけられる．しかしながら，現在までその構造決定が行われたのみで，全合成に関する研究は行われていない．そこで本研究では，誘導体合成を視野に，**1** の全合成に着手した．

本ペプチドの L-Val から L-Ala までの構成アミノ酸の保護体は市販されているが，D-*allo*-Thr ユニットおよび 3-ヒドロキシ-4-メチルテトラデカン酸(HMTA)ユニットについては，調製しなければならない．また，D-*allo*-Thr ユニットおよび立体障害の少ない HMTA ユニットの間での分子内環化反応は，円滑に進行する可能性がある．したがって，L-Val から L-Ala のペプチド鎖を合成した後，D-*allo*-Thr ユニットおよび HMTA ユニットを組み込み，最終的に環化する合成計画を立てた．

L-Val のアリルエステルを起点とし，HBTU を縮合剤に用いたペプチド鎖の伸長と，Boc 基の除去を繰り返し行い，8 段階，収率 30%で L-Val から L-Ala までのペンタペプチドユニットを合成した．また，オキサゾリン環形成により，3 位水酸基の反転を行うことで，D-Thr から D-*allo*-Thr ユニットを 5 段階，収率 37%で合成した．さらに，プロパルギルアルコールから，シャープレス酸化および増炭反応を経由して，10 段階，収率 3%で HMTA ユニットの合成を行った．現在，ペンタペプチドユニットに対する D-*allo*-Thr ユニットと HMTA ユニットの縮合および環化反応の検討を行っている．




W493 A, cyclodepsipeptide, antifungal substance

講演番号：2C15p05
講演日時：3 月 18 日 15:00～ C 校舎 15 会場

# クモ毒にひそむチロシナーゼ阻害活性の化学的アプローチによる探索

# Investigation of spider toxins as tyrosinase inhibitors from chemical approach

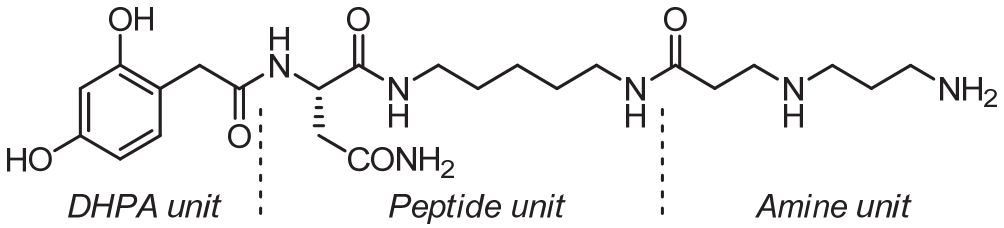
○舞木 鏡徳、小木 万里子、二瓶 賢一（宇都宮大農）
○ Akinori MOUGI, Mariko OGI, Ken-ichi NIHEI (Faculty of Agriculture, Utsunomiya University)

クモはその毒によって昆虫を麻痺させ，捕食を開始する．クモが鋏角で噛みついたとき，麻痺性クモ毒が注入されると同時に，昆虫の外皮組織は破壊される．昆虫の体内にはチロシナーゼが存在し，この破壊が引き金となってフェノール類の酸化が始まる．昆虫組織の褐変と硬化，すなわち食餌の変質は，この酸化反応が遠因となる．クモは数日間，捕獲した昆虫を食用とする場合があり，したがって，その変質を防ぐ化合物がクモ毒液内に含まれる可能性は否定できない．

クモ毒の構造を観察すると，2,4-ジヒドロキシフェニル酢酸(DHPA)ユニットが頻繁に見出される．DHPA ユニットは，チロシナーゼ阻害活性を示す 2,4-ジヒドロキシジヒドロ桂皮酸と構造類似である．したがって，クモ毒本体がチロシナーゼ阻害剤として働くのではないかと推察される．しかしながら，現在までクモ毒のチロシナーゼ阻害活性に関する研究はあまり行われていない．そこで本研究では，DHPA ユニットを持ち，最もシンプルな構造を有するクモ毒のスパイダミンに着目し，その化学合成とチロシナーゼ阻害活性の評価を行った．

市販のジヒドロキシベンズアルデヒドを増炭し，Pinnick 酸化を行うことで，DHPA ユニットを 4 段階，収率 66%で得た．カダベリン誘導体とアスパラギン誘導体とのカップリングを行い，ペプチドユニットを 2 段階，収率 72%で合成した．また，1,3-プロパンジアミン誘導体に対して，アクリル酸メチルによる Michael 付加を行い，得られた二級アミンを保護した後，けん化することで，アミンユニットを 4 段階，収率 71%で合成した．

縮合剤を用いて，得られた DHPA ユニット，ペプチドユニットおよびアミンユニットをカップリングし，全ての保護基を除去して，総収率 19%でスパイダミンの化学合成を達成した．スパイダミンのチロシナーゼ阻害活性を測定したところ，100 μM の濃度で，酵素活性を 19%阻害することが分かった．本研究により，グルタミン酸受容体に対する阻害活性と殺虫作用以外に，スパイダミンがチロシナーゼ阻害活性を示すことを初めて明らかにした．




spidamine, tyrosinase inhibitor, chemical synthesis

講演番号：2C15p06
講演日時：3 月 18 日 15:25～ C 校舎 15 会場

# 高親水性ウロリチン類の化学合成研究

# Chemical synthesis of urolithins having hydrophilic property

○張間 紗希[1]、小松 渡[2]、矢ヶ崎 一三[3]、二瓶 賢一[1]([1]宇都宮大農、[2]獨協医大、[3]宇都宮大バイオ)
○Saki HARIMA[1], Wataru KOMATSU[2], Kazumi YAGASAKI[3], Ken-ichi NIHEI[1] ([1]Faculty of Agriculture, Utsunomiya University, [2]Dokkyo Medical University, [3]Center for Bioscience Research and Education, Utsunomiya University)

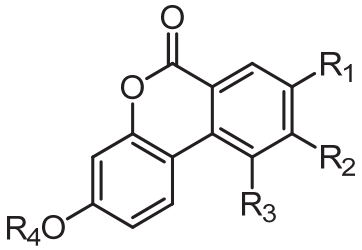
ウロリチン類は，腸内細菌の働きにより，イチゴやラズベリーなどに含まれるエラグ酸が分解することで生成する．さらに，腸内においてこれらのウロリチン類から，水溶性の様々な配糖体が派生することが示唆されている．

ポリフェノールであるウロリチン類には，強い抗酸化性が期待できる．また，この化合物群は，チロシナーゼの活性中心に対して強い親和性を示すモノフェノール，*o*-ジフェノールおよびレゾルシノールの骨格を有し，チロシナーゼ阻害剤として働く可能性が高い．さらに，ウロリチン A(**1**)は老化した筋肉の回復に関与するとの報告もある．

しかしながら，ウロリチン類は一般的に有機溶媒にも水にも溶けにくく，その難溶性は生理活性評価を行う際の大きな障害となっている．また近年，微量なウロリチン類の存在も示唆されており，それらの生理活性を明らかにするためには，有機合成による化合物の供給が必須である．そこで，ウロリチン類の溶解性の向上と誘導体ライブラリーの構築を目指し，ウロリチン配糖体の化学合成研究を行った．

Hurtley 反応を鍵段階として，市販の 2-ブロモ安息香酸とレゾルシノールから，ウロリチン B(**2**)を得た．この **2** に対し，トリクロロアセトイミデート法によるグルコシル化反応を行い，さらに全て保護基を除去して，ウロリチン B グルコシド(**3**)を総収率 24%で化学合成した．

ウロリチン A(**1**)は 2-ブロモ-5-メトキシ安息香酸とレゾルシノールから，Hurtley 反応と脱保護反応を経由して，収率 63%で合成した．同様の工程により，2-ブロモ-4,5-ジメトキシ安息香酸とレゾルシノールから，ウロリチン C(**4**)を収率 6%で得た．また，3,5-ジメトキシ安息香酸メチルを出発物として，2 位の臭素化，けん化，Hurtley 反応および保護基の除去を行い，微量成分であるウロリチン M7(**5**)の化学合成を達成した(収率 4%)．現在，**1**，**4** および **5** のグルコシル化反応の条件検討を行っている．




**1**: $R_1$ = OH, $R_2$ = $R_3$ = $R_4$ = H
**2**: $R_1$ = $R_2$ = $R_3$ = $R_4$ = H
**3**: $R_1$ = $R_2$ = $R_3$ = H, $R_4$ = Glc
**4**: $R_1$ = $R_2$ = OH, $R_3$ = $R_4$ = H
**5**: $R_1$ = $R_3$ = OH, $R_2$ = $R_4$ = H

urolithin, glycoside, Hurtley reaction

講演番号：2C15p07
講演日時：3 月 18 日 15:40～ C 校舎 15 会場

# 親水性に優れるチロシナーゼ阻害剤，ジヒドロオキシレスベラトロール配糖体の分子デザイン

# Molecular design of dihydrooxyresveratrol glycosides as water-attracting tyrosinase inhibitors

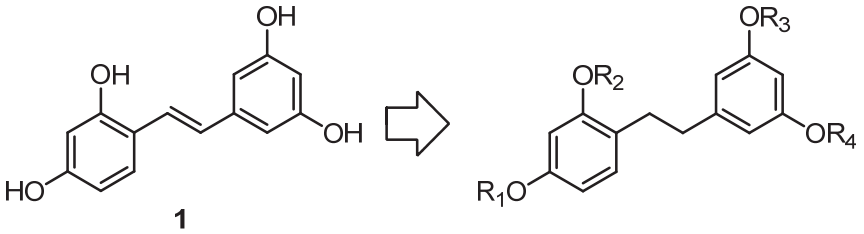
○田中 優理、鈴木 茉莉那、小太刀 悠佳、二瓶 賢一（宇都宮大農）
○Yuri TANAKA, Marina SUZUKI, Yuka KODACHI, Ken-ichi NIHEI (Faculty of Agriculture, Utsunomiya University)

オキシレスベラトロール(**1**)は，マルベリー(*Morus alba*)から単離・構造決定されたスチルベン骨格を有するポリフェノールであり，強力なチロシナーゼ阻害活性を示すことが知られている．しかしながら，一般的にスチルベン類は光に対して不安定で，かつ水に溶けにくいため，その利用範囲が制限されている．そこで本研究では，光に比較的安定な非共役系のビベンジル骨格および親水性の配糖体構造を有する新規チロシナーゼ阻害剤 **2-4** の分子デザインを行った．さらに，Appel 反応，Wittig 反応および Schmidt 配糖体化反応を鍵段階として，これらジヒドロオキシレスベラトロール配糖体の化学合成を計画した．

Appel 反応などを用いて，市販のジヒドロキシベンズアルデヒドを Wittig 試薬へと誘導した．また，市販のジヒドロキシベンズアルデヒドの 2 つの水酸基を保護し，Wittig 反応の際のアルデヒドアクセプターを調製した．以上の 2 つの前駆体を用いて，Wittig 反応を行い，非対称スチルベンを合成した．得られたスチルベンの二重結合を，パラジウムエチレンジアミン錯体を使用した水素添加反応により還元し，ビベンジルへと導いた．

ビベンジル骨格上の 4-レゾルシノール構造，もしくは 5-レゾルシノール構造の保護基を選択的に除去し，アグリコン部分を化学合成した．市販の糖からトリクロロアセトイミデートを調製し，その糖ドナーを用いて Schmidt 反応を行い，配糖体を得た．最後に，加水素分解などにより全ての保護基を除去し，目的とするジヒドロオキシレスベラトロール配糖体の化学合成を達成した(総収率 9-21%)．

得られた配糖体を HPLC で精製した後，チロシナーゼ阻害活性の評価を行った．その結果，下図の $R_3$ の位置にキシロース構造を有する配糖体が，市販のチロシナーゼ阻害剤であるコウジ酸よりも，約 3 倍の強い阻害活性を持つことが明らかになった．このように本研究の遂行により，親水性に優れるジヒドロオキシレスベラトロール配糖体型チロシナーゼ阻害剤の新規開発が達成された．




**1**

**2**: $R_1 = R_2 = R_3 = H$, $R_4$ = Sugar
**3**: $R_1$ = Sugar, $R_2 = R_3 = R_4 = H$
**4**: $R_1 = R_2 = H$, $R_3 = R_4$ = Sugar
**5**: $R_1 = R_2$ = Sugar, $R_3 = R_4 = H$

tyrosinase inhibitor, dihydrooxyresveratrol, molecular design

講演番号：2C15p08
講演日時：3 月 18 日 15:55～ C 校舎 15 会場

# シロイヌナズナ由来糖転移酵素 UGT78D2 を用いたフラバン-3- オール誘導体の配糖体合成研究

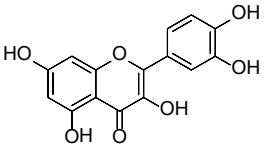
# Synthetic study of flavan-3-ol glycosides by glycosyltransferase UGT78D2 derived from Arabidopsis

○西村 拓哉[1]、柴﨑 亨[2]、濱田 義知[2]、小堀 亮[1]、西野 祐樹[1]、川崎 崇[3]、齊藤 安貴子[1,2] ([1]大阪電通大工・環境、[2]大阪電通大院工・先端、[3]立命館大・薬)

○Takuya Nishimura[1], Tohru Shibasaki[2], Yoshitomo Hamada[2], Ryo Kobori[1], Yuki Nishino[1], Takashi Kawasaki[3], Akiko Saito[1,2] ([1]Faculty of Engineering, Osaka Electro-Communication University, [2]Graduate School of Engineering, Osaka Electro-Communication University, [3]Department of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University)

【目的】

フラバン-3-オール誘導体は様々な植物体に含まれており、我々が日々大量に摂取している化合物群であることから食経験が豊富な高機能性物質として注目されている。一方で、これらは比較的単純な構造を持つ化合物にも関わらず、植物内で多様な修飾がなされ、純粋にそれぞれの化合物を単離・構造決定することが極めて困難な化合物としても知られる。我々は、フラバン-3-オール誘導体の立体や化学的修飾が生物活性にどのように影響するのか、また、どのような構造がより高い活性を示すのかを明らかにしたいと考え研究を行っている。



1

**Figure 1. ケルセチンの構造**

これまでに我々は、フラバン-3-オール類の位置選択的ガロイル基導入法の開発、および、それらの構造-活性相関研究を進め報告している[1)]。本発表では、ケルセチン(**1**)を糖化可能なシロイヌナズナ由来の糖転移酵素 UGT78D2[2,3)]を用い、フラバン-3-オールのガロイル誘導体など、様々な構造を持つ化合物配糖化反応を検討したので報告する。

【方法・結果】

フラバン-3-オールのガロイル誘導体[1)]を用いて配糖化反応の検討を行なったところ、(+)-カテキンから誘導した化合物 **2**、**3** の配糖化生成物が得られた。一方で、3 位の水酸基の立体が異なる(–)-エピカテキンから誘導した化合物群では反応が進行しなかった。本発表ではこれらの反応の詳細について報告する。

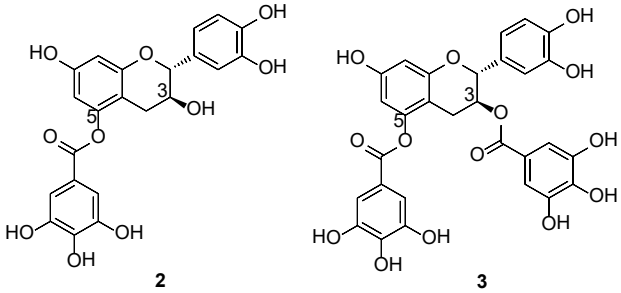



**Figure 2. 配糖化反応が進行した化合物 2、3 の構造**

1) K. Mori *et al*., *Nat. Prod. Chem. Res*., **3**, 172, 2015.
2) HJ. Kim *et. al., Biosci. Biotechnol. Biochem.,* **70**, 1471-1477, 2006.
3) GB. Kim *et. al., Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **93**, 244724-53, 2012.

flavan-3-ol glycoside, glycosyltransferase, polyphenol

発表責任者：齊藤安貴子（a-saito@osakac.ac.jp）

講演番号：2C15p09
講演日時：3 月 18 日 16:10～ C 校舎 15 会場

# サトウダニ *Carpoglyphus lactis* における脂肪族アルデヒドを基質とする炭化水素生合成酵素の探索

# Hydrocarbon biosynthesis from fatty aldehyde as substrate in *Carpoglyphus lactis* (Acari: Astigmate)

○森山 太介[1]、森 直樹[2]、桑原 保正[3,4]、清水 伸泰[1] ([1]京都学園大院バイオ環境、[2]京大院農・応用生命、[3]富山大工・生工研セ、[4]JST, ERATO)
○Daisuke MORIYAMA[1], Naoki MORI[2], Yasumasa KUWAHARA[3,4], Nobuhiro SHIMIZU[1] ([1]Kyoto Gakuen Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Toyama pref. Univ., [4]JST, ERATO)

貯穀害虫として知られているサトウダニ *Carpoglyphus lactis* は一般的な動物には生合成できないとされる linoleic acid (LA) の生合成能を有する．同位体標識化合物を用いた取り込み実験において，ダニの分泌成分の一つである(*Z,Z*)-6,9-heptadecadiene (6,9-C17) は LA から誘導されることが証明された.[1)] 6,9-C17 はコナダニ類に広く分布しており，主にフェロモンなどを放出する際の溶媒としての役割を果たすと考えられる．本研究ではサトウダニが分泌する 6,9-C17 の生合成酵素の同定を目的とする．

キイロショウジョウバエの炭化水素生合成研究では，生合成前駆体のステアリルアルデヒドがシトクロム P450，酸素分子，NADPH の作用で heptadecane に変換されると報告されている.[2)] その知見をもとに 6,9-C17 の前駆体を linoleyl aldehyde (LAld) と仮定した．昨年度，サトウダニをホモジネートして得られた粗酵素液を遠心分離法によって分画したミクロソーム画分に酵素活性が見られ，その画分の可溶化に成功した．さらに反応条件の検討を行い，反応時間の短縮および活性が失われない保存方法を確立した.[3)]

今回は硫安分画による精製と活性画分の脱塩，重水素ラベル化 LAld-$d_2$ を基質とした変換反応を検討した．また各種クロマトグラフィーによる精製を行ったので，それらの結果を併せて報告する．

1) N. Shimizu *et al*., *Insect Biochem. Mol. Biol.* 45:51-57 (2014).
2) Q. Yue *et al., PNAS* 109:14858-14863 (2012)
3) 日本農芸化学会 2016 年度大会，札幌

Astigmatid mite, Hydrocarbon, Biosynthesis

講演番号：2C15p10
講演日時：3 月 18 日 16:25～ C 校舎 15 会場

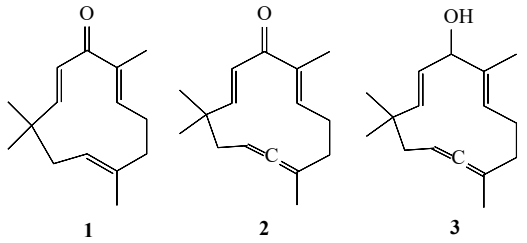
# 新規アレン型 zerumbone の合成と多様な反応性検討

# Synthetic study of novel allene-zerumbone showing its diverse reactivity

○北村 優斗、巽 大明、亀尾 昌樹、宇高 芳美、北山 隆（近畿大院・農・バイオ）
○Yuto KITAMURA, Hiroaki TATSUMI, Masaki KAMEO, Yoshimi UTAKA, Takashi KITAYAMA
(Major in Advanced Bioscience, Graduate School of Agriculture, Kindai University)

【緒言】

ゼルンボン **1** は、ショウガ科ショウガ属に属するハナショウガの根茎部が乾燥重量当たり 3～4%含有される 11 員環フムレン型セスキテルペンである。共役二重結合、孤立二重結合、カルボニル基をもち非常に高い反応性を示すことから「多様な反応性をもつ天然材料を利用した有機合成(*NMRDOS*)」の材料として優れている。そこで我々はゼルンボンの反応活性を上げることを目的に環内にアレン基を導入することに着目した。アレン基は高い反応性、かつ軸不斉をもつ魅力的な官能基である。その中でも環状アレンは複雑な骨格変換の有用中間体として、天然物合成などに広く利用されている。さらにその光学活性体は立体選択性を必要とする高度な制御を可能とするが、これまでの報告例は少ない。我々は **1** を出発物質として、4 ステップでアレン型ゼルンボン **2** を得た[1]。**2** は、**1** の環状骨格を 1 炭素増加した 12 員環ケトンで、アレン基とゼルンボンの高い反応活性の相乗効果により、新たな *DOS* の材料として優れていると期待できる。そこで、アレン型ゼルンボンの反応性を検討し、新たな骨格形成へ導くことに成功したので報告する。




【結果】

**2** の還元体であるアレン型ゼルンボール **3** には 2 種類のジアステレオマーが存在するため、それらを用いて PHPLC によりジアステレオマーを完全に分離した。続いてリパーゼ触媒を用いたトランスエステル化による速度論的光学分割を試みたところ、高立体選択的に **3** が得られ、これを酸化することにより光学活性アレン型ゼルンボン **2** を得ることに成功した。また **3** をエステル化し、これを酸性条件下に供したところ、1 位から 3 位に速やかにエステルが転位し、これを加水分解後に酸化することで新規アレン型ゼルンボンを得ることに成功した。これは **2** とは異なる反応性を示すことが予想される。また **3** を過剰の塩酸下に供すると、上記と同様の転位反応を経由して塩化物中間体が得られ、連続的かつ競争的にさらに反応が進行し、多様な骨格が生成する興味深い反応性を見いだした。

1. Kitayama, T. et al. *Tetrahedron*. **2006,** *62*, 10859-10864

Allene, zerumbone, Diversity

発表責任者：北山隆（kitayama@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：2C15p11
講演日時：3 月 18 日 16:50～ C 校舎 15 会場

植物の気孔密度を制御するペプチドホルモン stomagen の構造活性相関
Studies on the structure-activity of stomagen that control stomatal density
○植田 健太、根岸 佑香里、近藤 竜彦、小鹿 一 (名大院・生命農)
○Kenta Ueda, Yukari Negishi, Tatsuhiko Kondo, Makoto Ojika (Nagoya Univ.)

【背景・目的】
植物は陸上に進出する際に、体表面からの水分消失を防ぎ、ガス交換や蒸散を効率よく行うために気孔を発達させた。その機能は植物の生存に必須であり、気孔は適切な密度と位置に形成されるよう、精密に制御されている。近年の研究により、気孔の分化過程や表皮のパターン形成に重要な情報伝達因子が次々と同定されている。stomagenは気孔分化を誘導し気孔密度を上昇させるという興味深い活性を持つ45残基のペプチドホルモンとして発見された。2015年、stomagenの受容メカニズムが明らかとなり、同じEPFファミリーに属するEPF2と競合的にERECTA-TMM受容体複合体に結合することが明らかとなった。本研究では、将来的にstomagenの構造を基盤とした気孔密度制御剤の開発を目標として、まず、stomagenの構造活性相関、特に活性発現に必須なファーマコフォアに相当する部分を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】
stomagenのループ構造部分のアラニンスキャンおよびstomagenの活性をミミックする小ペプチドを用いた検討の2通りのアプローチで研究を行った。*Brevibacillus*分泌発現系を用いて、stomagenを得る手法について昨年の本大会で報告した。活性発現に重要とされる分子中央部のループ構造にアラニン置換を導入した一連の誘導体を調製し、活性を調べた結果、ループ構造の中央部が活性発現に重要であることが示唆された。しかし、発現自体が困難なペプチドが複数あり、構造活性相関を議論するには不十分であった。そこで次に、stomagenのループ部分を模して設計した28残基の合成ペプチド、stomagen-loopを用いた検討を行った。stomagen-loopはstomagenより若干弱いものの気孔密度上昇活性を示したことから、stomagen-loopのループ構造部分のアラニン置換体を合成し活性を調べた。この手法では*Brevibacillus*が発現しなかったアラニン置換体についても化学合成して活性を検討することができ、やはりループ構造中央部が活性発現に重要であることが示唆された。以上の結果からstomagenのループ構造中央部の6残基が活性発現に重要であることが明らかとなった。現在、この部分を模した低分子ミミックを設計し、その生理活性について検討しており、その結果についても併せて報告する予定である。

stomagen, stomatal density, structure-activity relationship

講演番号：2C15p12
講演日時：3 月 18 日 17:05～ C 校舎 15 会場

疫病菌交配ホルモンの生産プロファイルの多様性
Production Diversity of the *Phytophthora* Mating Hormones
○戸村 友彦、大西 裕貴、小鹿 一（名大院生命農）
○Tomohiko TOMURA, Yuki ONISHI, Makoto OJIKA (Nagoya Univ.)

【背景・目的】

植物疫病菌（*Phytophthora* 属糸状菌）は、ジャガイモなどの重要農作物に甚大な被害を与える。疫病菌は有性生殖を営むが、薬剤耐性化や悪性化の要因とも考えられるため、有性生殖メカニズムの分子レベルでの解明は、疫病菌の防除に繋がる重要な課題と言える。自家不和合性（ヘテロタリック）疫病菌種の有性生殖は、2 つの交配型 A1 と A2 が出会い、相手が分泌する交配ホルモン（α1 とα2）を認識することで開始される。これまでに両ホルモンの構造や生合成経路が右図のように解明されているが、ホルモン受容体・合成系などケミカルバイオロジー的課題が未解明である（図）。本研究では、生合成機構の解明を目指し、交配ホルモン生産に影響を与える因子について検討した。

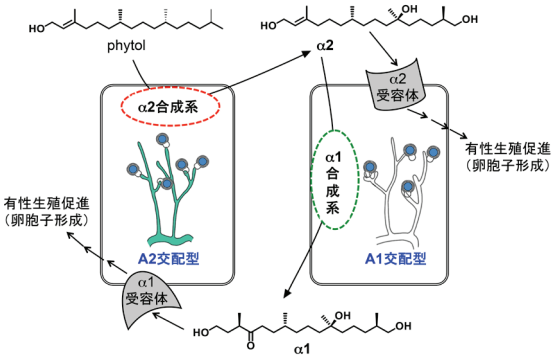


図. 交配ホルモンα1、α2 とその生合成経路

【方法・結果】

5 種の疫病菌株を生合成前駆体（phytol またはα2）添加 20% V8 ジュース液体培地で振とう培養し、培養上清中のα2、α1 を LC/MS で経時的に定量した。その結果、A1 型はα1 のみ生産するが、従来α2 を生産するとされていた A2 型には 3 つの生産タイプ（α2 のみ、α1 のみ、両方）が存在することが初めて明らかとなった。ホルモン生産が最大になる時期は培養開始 2～7 日目と株により様々で、A2 型では菌体生長による pH 上昇とほぼ同期するのに対し、A1 では菌体生長前に上昇した。以上より、交配ホルモンの生産パターンは菌株ごとに多様であることがわかった。さらに両交配ホルモンを生産できる *P.capsici*（A2 型）を用いて、培地の影響を調べた。V8 ジュース液体培地では約 1：1 だったα1 とα2 の比は、Czapek-Dox 人工培地でα2 に大きくシフトし、菌体あたりのα2 生産量は V8 ジュースの 16 倍に達した。一方、*P. nicotianae* と *P. cryptogea* は V8 ジュース液体培地中でホルモン生産が促進されたため、V8 ジュース中のどの成分が影響を与えるか調べた。V8 ジュース上清を ODS カラムで吸着画分と非吸着画分に分離し、超純水に添加し培養したところ、吸着画分（低極性成分）でホルモン生産量が促進された。以上より、培養時間に加え培地が与える影響も菌株によって多様なことがわかった。現在、自家和合性（ホモタリック）疫病菌種においても生産プロファイルを確認している。

*Phytophthora*, mating hormone, plant pathogen

発表責任者：小鹿一（ojika@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2C15p13
講演日時：3 月 18 日 17:20～ C 校舎 15 会場

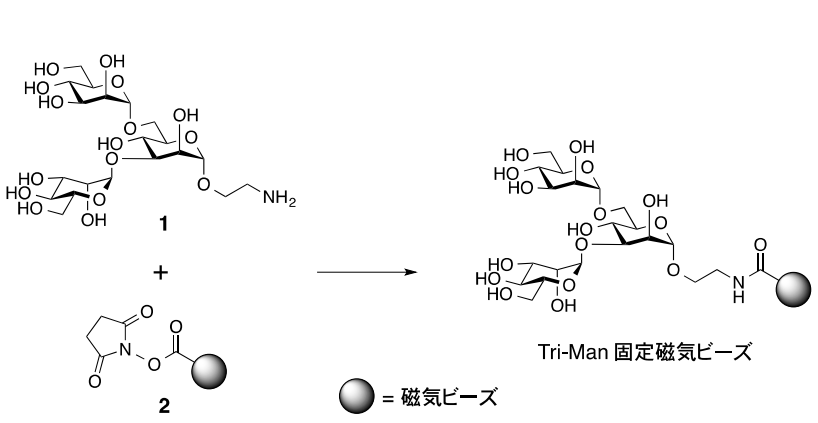
# 糖鎖結合性天然物の探索に向けたオリゴ糖固定磁気ビーズの合成と評価

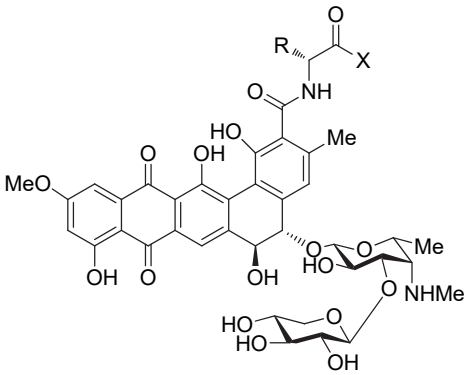
# Synthesis and evaluation of oligosaccharide-attached magnetic beads toward screening of natural products with sugar-binding properties

○宮西 航、中川 優、小鹿 一 (名大院・生命農)
○Wataru Miyanishi, Yu Nakagawa, Makoto Ojika (Nagoya Univ.)

**目的**：糖鎖は多彩な生物学的機能をもっており，核酸やタンパク質と並ぶ「第三の生命鎖」として注目を集めている．それに伴い，糖鎖の機能を解析するためのツール分子として，また糖鎖を標的とした創薬リードとして糖鎖に結合する低分子化合物の必要性が高まっている．本研究では，核酸やタンパク質の精製などに利用されている磁気ビーズが糖鎖結合性天然物の探索に応用できるかどうかを検証することを目的とした．

**方法と結果**：高マンノース型および混合型糖鎖の部分構造であるマンノトリオース (Tri-Man) を固定した磁気ビーズを合成し，本磁気ビーズによってマンノース結合性低分子化合物 Pradimicin (PRM) を捕捉できるのかどうかを検証することとした．Tri-Man 固定磁気ビーズは，アミノ基を導入した Tri-Man (**1**) を合成し，NHS 基をもつ磁気ビーズ (**2**) とのカップリングにより調製した．この Tri-Man 固定磁気ビーズとマンノースに対するアフィニティーの異なる三種の PRM (PRM-A, PRM-FA1, PRM-Amide) を MOPS buffer 中で混合し，磁気分離後に 50 % $CH_3CN/H_2O$ を添加して磁気ビーズに捕捉された各 PRM を回収した．HPLC による定量分析の結果，磁気ビーズによる PRM の回収量はマンノースに対するアフィニティーの強さに依存することが明らかとなった．本結果は，PRM が磁気ビーズに固定した Tri-Man 部分に特異的に結合していることを示しているとともに，糖鎖固定磁気ビーズが糖鎖結合性天然物の探索に利用可能であることを示唆している．



**PRM-A** : R = Me, X = OH
**PRM-FA1** : R = $CH_2OH$, X = OH
**PRM-Amide** : R = Me, X = $NHCH_2CH_2OH$

Magnetic beads, Natural product screening, Pradimicin

講演番号：2C15p14
講演日時：3 月 18 日 17:35～ C 校舎 15 会場

# 新規低毒性 X 線応答物質の探索

# Screening for new non-toxic X-ray responsive substance

○外山 実千留[1]、森 崇[1]、高橋 淳子[2]、岩橋 均[1] ([1]岐阜大応用生物、[2]産総研)
○Michiru TOYAMA[1], Takashi MORI[1], Junko TAKAHASHI[2], Hitoshi IWAHASHI[1] ([1]Gifu Univ., [2]AIST)

【背景・目的】

X 線のエネルギーによって何らかの応答を示す物質を X 線応答物質と定義する。ポルフィリンは低毒性で X 線によって活性酸素種（ROS）を生成するという特徴から、放射線療法において放射線増感剤として使用できるのではないかと考えられている。しかしポルフィリン以外の低毒性 X 線応答物質は発見されておらず、新たな低毒性の X 線応答物質が期待されている。そこで低毒性であると考えられる植物由来の成分からの探索を行ったところ、フラボノイドの一種であるルテオリンに X 線照射による ROS 生成反応が見られた。本研究ではルテオリンのさらに詳細な X 線応答メカニズムを解析するため、X 線照射によって発生する ROS の種類の特定を試みた。

【方法】

ルテオリンから生成されるスーパーオキシド（$O_2^{\cdot-}$）を測定するため、$O_2^{\cdot-}$検出試薬ジヒドロエチジウム（DHE）と $O_2^{\cdot-}$を特異的に消去するスーパーオキシドジスムターゼ（SOD）を併用した。UV または X 線照射後、生成されたエチジウムの蛍光強度をマイクロプレートリーダーで測定した。またヒドロキシラジカル（$OH^{\cdot}$）を測定するため、$OH^{\cdot}$検出試薬アミノフェニルフルオレセイン（APF）と $OH^{\cdot}$を特異的に消去するエタノールを併用した。UV または X 線照射後、生成されたフルオレセインの蛍光強度をマイクロプレートリーダーで測定した。

【結果・考察】

DHE と SOD を併用する実験を行った結果 UV、X 線で共に SOD を加えたことによる蛍光強度の減少が確認された。よってルテオリンは UV、X 線によって $O_2^{\cdot-}$を生成していると考えられる。また UV、X 線のエネルギーを変化させたところ、エネルギー依存的に蛍光強度減少量が増加した。この結果からルテオリンの $O_2^{\cdot-}$の生成はエネルギー依存的であると考えられる。

APF による実験を行った結果ルテオリンによる蛍光強度の増加は見られず、反対に蛍光強度が減少した。この蛍光強度の減少はルテオリンが $OH^{\cdot}$を消去したと考え、ルテオリンの $OH^{\cdot}$消去能を確かめる実験を行った。その結果ルテオリンの $OH^{\cdot}$消去能は非常に高いことが確認された。$OH^{\cdot}$は水に X 線や UV を照射することによって発生していると考えられる。よって APF による X 線照射実験において、ルテオリンを加えることによって蛍光強度が減少した原因として水の放射線分解による $OH^{\cdot}$をルテオリンが消去したことが挙げられる。したがって APF による X 線照射実験の結果は直接的な X 線応答ではない可能性がある。

以上の結果からルテオリンは X 線照射によって $O_2^{\cdot-}$を生成することが確認された。$OH^{\cdot}$についてはルテオリンの消去能が高すぎるため、X 線照射によって生成しているかを確認することは難しいと考えられる。

Radiosensitizer, Luteolin, Reactive Oxygen Species (ROS)

発表責任者：岩橋均（h1884@gifu-u.ac.jp）

講演番号：2C15p15
講演日時：3 月 18 日 17:50～ C 校舎 15 会場

# Cytokinine Oxidase/Dehydrogenase の蛍光分光法による活性測定法の開発
# A fluorescent spectroscopic assay for Cytokinine Oxidase/Dehydrogenase

○飯野 誠之、黒沼 亜希子、杉山 民二 (明治大院農)
○Masayuki IINO, Akiko KURONUMA, Tamizi SUGIYAMA (Meiji Univ.)

【目的】

サイトカイニンは植物ホルモンの一種であり、細胞分裂促進活性などを持つ化合物である。植物体内でサイトカイニンは FAD を補酵素とする Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase(CKX)により、アデニンとアルデヒドに不可逆的に分解される。アデニンは蛍光性に乏しい物質であるが、2 位にアミノ基が置換した 2,6-diaminopurine は高い蛍光強度を有することが報告されている。また、プリン骨格を三環性の ethenoadenine にすることで蛍光波長が長波長側にシフトする(Piritta Virta *et al.*, 2005、Einat Sharon *et al.*, 2006)。

そこで、2,6-diaminopurine を CKX 分解産物とする 2-amino-6-(2-isopentenylamino)purine (2-amino-iP)を合成し、従来用いられてきた基質であるイソペンテニルアデニンの代わりに基質とすることで、蛍光分光光度計を用いた、より簡便で高感度な CKX 活性測定法の開発を目指した。

【方法】

2-amino-6-(2-isopentenylamino)purine(2-amino-iP)の合成:2-amino-6-chloropurine を原料として、3-methyl-2-butenylamine hydrochloride, triethylamine, 1-BuOH を加え、6.5 時間還流した。Flash column chromatography ($CH_2Cl_2$:MeOH=47:3)により分離・精製した。

CKX 酵素活性測定法:電子受容体として 2,6-dichlorophenol indophenol を、緩衝液として Tris/HCl buffer(pH 8.5)を用いた。CKX 粗酵素標品を添加し、37℃で反応させた。

【結果・考察】

2-amino-iP の蛍光特性は Ex=297 nm, Em=349 nm であり、2,6-diaminopurine の蛍光特性は Ex=299 nm, Em=347 nm であった。2-amino-iP を基質として CKX 酵素活性測定を行ったところ、HPLC により 2-amino-iP のピークの減少を確認した。蛍光分光光度計により、基質の残存量の定量を試みたが、反応液中の他の成分の影響により定量が困難であった。そこで、2-amino-iP にかえて N6-(2-isopentenyl)-$N^2$,N3-ethenoadenine(ε-iP)を別途合成した。ε-iP の蛍光特性は Ex=290 nm, Em=412 nm であった。ε-iP を基質として CKX 酵素活性測定を行い、速度論的解析を進め、蛍光分光光度計による CKX 活性測定法の可能性を検討している。

cytokinine, cytokinine oxidase/dehydrogenase

講演番号：2C17a01
講演日時：3 月 18 日 09:20～ C 校舎 17 会場

# 二成分制御系阻害剤・ハロトリエン酸の合成検討

# Synthetic study of (2E,6E,10E)-11-bromo-4,4,7-trimethyldodeca-2,6,10-trienoic acid showing inhibition of the autophosphorylation of two-component system

○金 成優、北山 隆（近畿大院・農・バイオ）
○Seong Woo KIM, Takashi KITAYAMA (Major. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agric.)

【研究背景・目的】

近年、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）、バンコマイシン耐性腸球菌（VRE）や多剤耐性結核菌（MDR-TB）などの多剤耐性菌の出現により、既知抗生物質による感染症の治療はより困難なものとなっているため、多剤耐性菌に対しても効果的に機能する新規抗菌剤開発は急務である。

そこで我々は抗多剤耐性菌薬の開発を目的とし、細菌の情報伝達機構である二成分制御系（Two-component system ; TCS）に注目をして研究を進めてきた。TCS は、センサータンパク質である Histidine kinase (HK) と転写の調節を行う Response Regulator (RR) で構成されており、この二つのタンパク質間のリン酸転移を介して遺伝子発現を行う情報伝達システムである。また TCS が、耐性菌の主要因となる排出ポンプ発現遺伝子や病原性遺伝子、細胞増殖に必須な役割を担う遺伝子を制御することや、人を含む高等動物細胞では保存されていないことから、新規抗菌剤開発における創薬ターゲットとして非常に重要であると考えられる。

当研究室では以前、ゼルンボン（**1**）の臭素化後に環開裂反応によって誘導したハロトリエン酸（**2**）がグラム陽性菌の細胞増殖に必須な二成分制御系 WalK/WalR(化合物の開発当時は YycG/YycF)の HK（WalK）の自己リン酸化を阻害し、**2** の 10*E* 体が活性本体であることを初めて見いだした[1,2]。**1** は東南アジアで広く栽培される多年草植物であるハナショウガの根茎部から多量に単離精製できる 11 員環フムレン型セスキテルペンであるが、安定的にハナショウガを栽培するのは困難である。このように興味深い作用機作を示す **2** は新規抗菌剤開発におけるリード化合物として期待できるが、**2** の作用活性部位は明確ではない。そこで、構造活性相関研究を進めるため、**1** を経由しない **2** の合成研究に着手した。

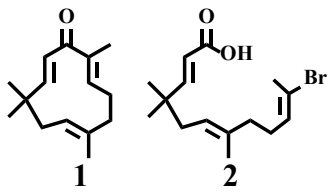


**Figure.1 Zerumbone and Halotrienoic acid**

【方法および結果】

**2** の逆合成解析を検討したところ、γ-Butyrolactone を出発物質に用いることで、Wittig 反応、HWE 反応を鍵反応として目的物を得られると考えた。本発表では詳細について報告する。

【参考文献】

1) Kitayama, T. et al, *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **2001**, *65*, 2306-2310.
2) Kitayama, T. et al, *Biosci. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5943-5946.

Two component system, inhibitor, zerumbone

発表責任者：北山　隆（kitayama@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：2C17a02
講演日時：3 月 18 日 09:35～ C 校舎 17 会場

# 枯草菌二成分制御系 WalRK の熱ストレス応答と生育必須性に関する解析

# Heat stress response of WalRK and its essentiality in Bacillus subtilis

○高田 啓[1,2]、植田 修平[3]、志波 優[1]、渡辺 智[2]、千葉櫻 拓[2]、内海 龍太郎[3]、吉川 博文[2] ([1]立教大・生命理、[2]東京農大・バイオ、[3]近畿大・バイオ)
○Hiraku TAKADA[1,2], Syuhei Ueda[3], Yu Shiwa[1], Satoru Watanabe[2], Taku Chibazakura[2], Ryutaro Utumi[3], Hirofumi Yoshikawa[2] ([1]Rikkyo Univ., [2]Tokyo Univ. of Agriculture, [3]Kinki Univ)

低 GC グラム陽性細菌に広く保存されている必須 2 成分制御系遺伝子 WalRK は、細胞表層の恒常性や脂肪酸合成制御・病原性・バイオフィルム形成など、生物種によって様々な機能が報告されている (1)。枯草菌において WalRK は D.L-endopeptidase (LytE, CwlO) の発現を促進する一方で、D.L-endopeptidase の阻害因子である IseA や PdaC の発現を抑制することで、細胞壁の恒常性維持に寄与していると考えられている (2, 3, 4)。また、WalK のキナーゼ活性を負に制御する因子として、膜タンパク質 WalH・WalI が報告されている(5)。WalRK のレギュロンである *lytE* と *cwlO* の二重欠失は合成致死であるため、WalRK の必須性はこれら遺伝子の発現を保証することであると示唆されてきたが、現在までのところ、その証明はなされていない (6)。そこで、高温ストレス時の WalRK の機能や生育必須性の検証することを本研究の目的とした。

検証を行う過程で、WalRK のレギュロンである *cwlO* や *lytE* が高温で発現誘導されることがわかった。また、*walHI* 破壊株が温度感受性を示し、この温度感受性が *lytE* 破壊の導入によって抑圧されることを見出した。同様に LytE 阻害因子である IseA・PdaC の過剰発現によっても温度感受性が抑圧された。Phostag を用いた解析から、高温時に WalK の自己リン酸化レベルが上昇することから、*walHI* を破壊することで WalRK が過剰に活性化することが致死性の原因でることが示唆された。次に、IPTG の添加によって *lytE* 及び *cwlO* の発現誘導株において *walRK* の破壊を試みた。その結果、*lytE* 誘導株において *iseA* もしくは *pdaC* を欠失している条件において *walRK* の破壊が可能であった。一方で、*cwlO* 誘導株においては *iseA*・*pdaC* の二重欠失株において *walRK* の破壊が可能であった。これらの結果を踏まえ、高温ストレス時の WalRK の機能や生育必須性について議論したい。

(1) Dubrac,. *et al*.(2008) *Mol Microbiol*.70(6):1307-22.
(2) Howell A,. *et al*. (2003) *Mol Microbiol*.49(6):1639-55.
(3) Yamamoto H,. *et al*. (2008) *Mol Microbiol*.70(1):168-82.
(4) Kobayashi K,. *et al*.(2012) *J Biol Chem*.287(13):9765-76
(5) Szurmant H,. *et al*.(2008) *PNAS*.105(15):5891-6
(6) Winkler ME, Hoch JA.(2008) *J Bacteriol*.190(8):2645-8.

Bacillus subtilis, WalRK, cell wall

講演番号：2C17a03
講演日時：3 月 18 日 09:50～ C 校舎 17 会場

SigI と WalKR による枯草菌の増殖維持の制御ネットワークの解析
Analysis of regulatory network of growth maintenance by SigI and WalKR in Bacillus subtilis
○朝井 計[1]、清水 葉子[1]、廣澤 早香[1]、高田 啓[2,3]、吉川 博文[3]([1]埼玉大理工、[2]立教大理、[3]東京農大応生科)
○ Kei ASAI[1], Yoko SHIMIZU[1], Sayaka HIROSAWA[1], Hiraku TAKADA[2,3], Hirofumi YOSHIKAWA[3] ([1]Saitama Univ., [2]Rikkyo Univ., [3]Tokyo Univ. of Agric.)

【目的】
枯草菌の代替シグマ因子の一つ SigI は熱ストレス応答シグマとして見出された。SigI のレギュロンとしてこれまで、MreBH（細胞骨格アクチン蛋白質の一つ)、BcrC（細胞壁合成阻害剤バシトラシン耐性)、LytE（細胞壁溶解酵素の 1 種、DL-endopeptidase）をコードする遺伝子が知られている。我々は、LB 液体培地培養で、定常期の後期に入ると *sigI* 破壊株では野生株に比べて、著しい細胞死が観察されたことから、熱ショック応答以外に定常期の細胞表層の恒常性維持に SigI が関っていると考え、本大会でこれまでに発表した。一方、WalK/WalR は低 G+C グラム陽性細菌に広く保存され、増殖と細胞表層の維持を関連付ける増殖に必須な 2 成分制御系である。SigI レギュロンと WalK/WalR レギュロンには重複する遺伝子があり、SigI 遺伝子の転写自身も WalK/WalR で制御されていることから、両制御系は増殖を通じて協調して働くシステムと考え、その働きと制御ネットワークの解明を目指し、解析を行っている。
【方法と結果】
WalK/WalR の正の転写制御機能を恒常的に活性化した変異株を作製した。変異株の対数期の増殖は、多少の細胞形態の異常はみられるものの、野生株とほぼ同一だった。一方、変異株は定常期に入ると、急激な濁度の減少が起こった。この濁度減少は SigI 破壊株で見られる濁度減少の時期よりも早かった。WalK/WalR は対数増殖期に活発に働き、定常期になると発現が弱まっていく。これに対し、SigI 遺伝子の発現は対数増殖期に弱く、定常期になり誘発される。WalK/WalR 制御系は定常期に入りその機能を低下させ、SigI 制御系にバトンを渡すことで、定常期の細胞維持は行われると考えている。
SigI のレギュロン遺伝子のプロモーター-35 領域の上流に転写活性を上昇させる、シス配列が存在している。SigI は LytE とは別の DL-endopeptidase である CwlO をコードする遺伝子やその他に DNA 合成・DNA 修復に関わる遺伝子の転写にも関わっているが、それらの遺伝子の SigI 認識プロモーター領域にはこのシス配列がない。現在このシス配列の役割についても解析を行っている。

Bacillus subtilis, cell wall, transcription

講演番号：2C17a04
講演日時：3 月 18 日 10:05～ C 校舎 17 会場

Toxin-Antitoxin 相互作用阻害剤の探索
Screeining of bacterial toxin-antitoxin inhibitors
○江川 広紀[1]、山口 良弘[2]、五十嵐 雅之[3]、内海 龍太郎[1] ([1]近大院農、[2]大阪市大、[3]微化研)
○ Hironori EGAWA[1], Yoshihiro YAMAGUCHI[2], Masayuki IGARASHI[3], Ryutaro UTSUMI[1] ([1]Kindai Univ., [2]Osaka City Univ., [3]Insititute of Microbial Chemistry)

原核生物には、生育や細胞死を制御する Toxin-Antitoxin (TA) systems が数多く存在し、様々なストレス環境下における生存に重要であることが明らかとなってきた[1)]。TA systems は菌の生育には必須ではないが、ほぼ全ての原核生物に存在する。TA systems は、通常の生育下では、Toxin に Antitoxin が結合し、複合体を形成することで Toxin の毒性を抑制している。しかし、Antitoxin は Toxin に比べ、不安定な物質であるため分解されやすく、ストレス等を受けることで分解される。そして、Antitoxin が分解されたことで Toxin が遊離し、毒性を示す。これにより菌の細胞死または生育の停止を引き起こす。この TA systems はヒトには存在しないため、その阻害剤は抗生物質のように微生物に対して致死効果が期待される。本研究では、細菌に広く保存されている MazE(Antitoxin)-MazF(Toxin)に着目し、MazE-MazF 相互作用を阻害する化合物を探索できるスクリーニングシステムの構築を行った。

スクリーニングシステムの構築のために大腸菌 BL21(DE3)株と BL21(DE3)のゲノム上にある *mazE* と *mazF* 遺伝子を欠損させた欠損株、BL21(DE3)に pColdⅡベクターに *mazE mazF* オペロンを組み込んだプラスミドを形質転換した MazE, MazF 高発現株を用いた。最初に、これらの株の培養温度や IPTG 添加量の条件検討とそれによる MazE と MazF タンパク質発現を SDS-PAGE で確認を行った。スクリーニングには、各種土壌微生物培養液のエタノール抽出物が用いられた。そして、その蒸発乾固物の DMSO 懸濁液が MazE-MazF 発現大腸菌の増殖に及ぼす効果を吸光度 ($OD_{600}$)でそれぞれ比較測定することにより評価した。その結果、MazE, MazF が高発現している大腸菌培養液に微生物抽出物を加えたことで、935 サンプル中 4 サンプルが増殖阻害効果を示した。さらに、MazE, MazF 高発現株の培養液から、MazE-MazF 複合体を精製し、その複合体に候補サンプルを加えて SDS-PAGE を行い、MazE-MazF の相互作用阻害を評価した。その結果、4 候補サンプルは直接的な MazE-MazF 相互作用に影響を与えていないことが示唆された。

[1)] Y. Yamaguchi, M. Inoue Nature Rev. Microbiol. 2011; 9: 779-790

toxin-antitoxin systems, mazE-mazF, screening

発表責任者：江川　広紀（1633690009b@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：2C17a05
講演日時：3 月 18 日 10:20～ C 校舎 17 会場

ヒスチジンキナーゼ阻害剤 waldiomycin の細菌細胞内での作用機構
Mode of action of waldiomycin in bacteria
○長尾 勇希[1]、村井 春香[1]、清水 莉子[1]、植田 修平[1]、岡島 俊英[2]、五十嵐 雅之[3]、江口 陽子[4]、内海 龍太郎[1] ([1]近畿大農、[2]大阪大産業科学、[3]微化研、[4]近畿大生物理工)
○Yuuki Nagao[1], Haruka Murai[1], Riko Shimizu[1], Syuhei Ueda[1], Toshihide Okajima[2], Masayuki Igarashi[3], Yoko Eguchi[4], Ryutaro Utsumi[1] ([1]Kindai Univ., [2]Osaka Univ., [3]Institute of Microbial Chemistry, [4]Faculty of biology-oriented Science and Technology)

細菌は様々な環境ストレスに適応するため、ヒスチジンキナーゼ（HK）とレスポンスレギュレーター（RR）からなる二成分制御系（TCS）という情報伝達機構を保持している。当研究室で見出された抗生物質 waldiomycin は様々な HK を標的とし、自己リン酸化を阻害することが明らかとなっている。*in vitro* において、大腸菌 HK, EnvZ の細胞内領域の二量体化（DHp）ドメインを用いて、作用機構研究を行った結果、各種 HK に共通に保存されている Hbox (リン酸化されるヒスチジン領域)内のアミノ酸 S242、D244、T247、P248 のアラニン置換体が waldiomycin に対して顕著な耐性化を示し、waldiomycin が細菌 HK の H-box に作用していることが明らかにされている。本研究では、waldiomycin が実際に、細菌細胞内で全長 EnvZ の H-box に対して作用することを明らかにしょうとした。また、大腸菌細胞内での waldiomycin の作用研究もおこなった。

Waldiomycin は大腸菌細胞内への取り込み能が低いので、細菌細胞内での waldiomycin の全長 EnvZ に対する自己リン酸化阻害を確認するため、EnvZ 過剰発現プラスミドを枯草菌に形質転換した株を用いて、phos-tag SDS-PAGE を行った。その後、Penta His 抗体を用いて Western blotting 法により自己リン酸化 EnvZ を検出した後に、waldiomycin の全長 EnvZ に対する自己リン酸化阻害能を評価した。その結果、細胞内においても waldiomycin は EnvZ の自己リン酸化を阻害していることが明らかとなった。さらに、IC50 で waldiomycin に対して耐性化を示した H-box 内の変異体が細胞内においても耐性化を示すかを確認した結果、S242A、T247A 変異体は細胞内において野生型と比較して、waldiomycin を添加してもリン酸化バンドの消失は確認されなかった。EnvZ の H-box 内の S242、T247 は waldiomycin の作用に重要なアミノ酸であることが明らかとなった。

大腸菌細胞内での waldiomycin の作用を調べるために、大腸菌外膜変異株(*imp*4213)NR685 を用いて、最少生育阻止濃度(MIC)や最少殺菌濃度（MBC）を評価した。
大腸菌 NR685 と枯草菌 168 に対する waldiomycin の MIC を測定した結果、6.25 μg/ml、1.56 μg/ml を示した。NR685 と 168 に対する waldiomycin の MBC は、それぞれ、50 μg/ml 以上と 3.13 μg/ml であった。waldiomycin は大腸菌において菌を死滅させずに、増殖阻害を引き起こしている一方、枯草菌においては、殺菌的に作用していることを示した。これらの結果は、大腸菌においては、増殖必須な HK が存在しなくて、複数の HK に waldiomycin が作用し抗菌活性を示していることが示唆された。

waldiomycin, histidine kinase inhibitor, two component system

発表責任者：長尾　勇希（1633690010f@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：2C17a06
講演日時：3 月 18 日 10:45～ C 校舎 17 会場

# 大腸菌の熱耐性における TA システムの機能の解明

# Analysis on the role of TA systems in *E. coli* heat tolerance

○益田 時光[1]、ファンミン ドク[2]、二石 彩映[2]、中山 文[1]、本城 賢一[1]、宮本 敬久[1] ([1]九大農、[2]九大院生資環)

○Yoshimitsu MASUDA[1], Duc Hoang Minh[2], Sae Futatsuishi[2], Aya Nakayama[1], Ken-ichi Honjo[1], Takahisa Miyamoto[1] ([1]Faculty of Agriculture, Kyushu Univ., [2]Faculty of Agriculture, Graduate School, Kyushu Univ.)

【目的】加熱処理が不十分な際に生じる熱損傷菌は細胞膜等の損傷により代謝、生育活性が著しく低下しており、生菌数測定に用いられる選択培地では検出できないが、回復に適した環境では生育を再開し、結果として食品の腐敗や食中毒を引き起こす可能性がある。

近年、ストレス耐性機構の主要な制御因子として Toxin-Antitoxin(TA)システムが注目されている。TA システムとは菌自身の生育を阻害する Toxin タンパクとその発現または作用を抑制する Antitoxin（タンパクまたは RNA）の組み合わせによる制御システムのことである。TA システムのバランスが、外的な因子等により Toxin の蓄積側に傾くことで菌体は休止状態となる。この休止状態の菌体を Persister と呼び、抗生物質や様々なストレスに対する耐性が高く、ストレスを生き延びた Persister が再び生育を始めることで、感染症の再発や食中毒の原因となる。本研究では、遺伝子破壊株等を用いて、TA システムと耐熱性、熱損傷菌発生さらに Persister 発生との関連を解明することを目的としている。

【方法】大腸菌遺伝子破壊株ライブラリー（Keio collection）から既知の TA システム（HipBA、YafQ/DinJ 等）遺伝子破壊株を選び、耐熱性、損傷菌発生率を調べた。TSB 培地中にて培養した遺伝子破壊株に対して、55℃、10 分間の加熱を行い、処理後に TSB 中で回復培養を行い、経時的に培養可能菌数を選択培地（DHL）もしくは富栄養培地（TSA）にて測定した。さらに、TA 遺伝子破壊株の細胞活性を観察する目的で、熱処理前後の膜電位（JC-1 染色)、呼吸活性（CTC 染色)、酵素活性（CFDA 染色）を蛍光顕微鏡にて観察を行なった。

【結果・考察】YafQ/DinJ の場合、Antitoxin である *dinJ* 破壊株に置いて熱耐性が顕著に向上した。Lon プロテアーゼによって HipB や DinJ が分解され、遊離状態となった HipA や YafQ が菌体内の翻訳を阻害することで Persister 形成を誘導することが既に知られており、DinJ の遺伝子破壊は Persister 形成をより促しやすくなっているのではと考えられる。一方で、HipAB や他の TA システムの破壊株においては、熱耐性や損傷菌の発生に有意な違いは見られなかった。このことから、各 TA システムはそれぞれ独立して様々な外的ストレスに対応していることが予想され、YafQ/DinJ のように熱耐性、損傷菌発生に影響を及ぼす TA も存在することが示された。また、*yafQ* または *dinJ* の破壊株では熱処理以前にすでに膜電位の低下が示され、細胞活性の低下、すなわち Persister 形成が促されていることが示唆され、この Persister 形成が熱耐性等に影響を及ぼしていることも考えられる。

Heat injured bacteria, Toxin antitoxin, Persister cells

発表責任者：益田時光（y.masuda@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：2C17a07
講演日時：3 月 18 日 11:00～ C 校舎 17 会場

# YjjJ および HipAB toxin-antitoxin system を介した persister 形成機構の解明

# Elucidation of persister formation mechanism mediated by YjjJ and HipAB toxin-antitoxin system

○前田 有紀[1]、成谷 宏文[2]、山口 良弘[1,3] ([1]阪市大院理、[2]広島大院生物、[3]阪市大複合先端研)
○Yuki MAEDA[1], Hirofumi NARIYA[2], Yoshihiro YAMAGUCHI[1,3] ([1]Osaka City Univ., [2]Hiroshima Univ., [3]OCARINA)

薬剤など様々なストレスに対して、一部の細菌は増殖を停止し、休眠 (persister) することで生存する。Persister は多剤薬剤耐性を示すことから感染症治療の大きな問題となっているが、依然として persister 形成機構は不明である。最近、persister 形成に toxin-antitoxin (TA) system が重要であることが示唆された。TA system は、原核生物において自らの生育および細胞死を制御すると考えられており、過剰発現により宿主自身に毒性を示す toxin およびその毒性を中和する antitoxin の二つのタンパク質から構成される。大腸菌の *hipA-hipB* TA system の *hipA* (high persister protein A) は、persister 形成に関与することが示唆されている。しかし、*hipA* 欠損株では野生株と同様に persister が形成されることから、*hipA* 以外の因子が persister 形成に関与することが示唆された。我々はこれまでに HipA toxin と相同性を有する YjjJ が toxin として HipB antitoxin と TA system を構成することを見出した。今回新たに、YjjJ が HipA と同様に自己リン酸化能を有すること、また、*yjjJ* および *hipA* 両遺伝子を欠損した株は野生株に比べて抗生物質に感受性を示すことを明らかにした。よって、persister 形成には両遺伝子が重要であることが示された。

【方法および結果】

HipA の自己リン酸化は persister 形成に関与することが示唆されている。そこで YjjJ の自己リン酸化を [$\gamma$-$^{32}$P]-ATP を用いて調べた結果、YjjJ も自己リン酸化することが明らかとなった。HipA のリン酸化部位およびリン酸化触媒部位を基に YjjJ のリン酸化部位およびリン酸化触媒部位を推測した。推測された YjjJ のリン酸化部位 (Ser200 および Ser201) およびリン酸化触媒部位 (Asp342) のアミノ酸置換変異体を構築し、自己リン酸化の有無を解析した。その結果、S200A または D342N YjjJ 変異体は自己リン酸化されなかった。よって、Ser200 がリン酸化部位、Asp342 がリン酸化触媒部位であることが示唆された。次に、HipA、HipB および YjjJ の persister 形成への影響を解析した。大腸菌 MG1655 株を親株として *hipA*、*hipB* および *yjjJ* の single および multiple 欠損株を作成し、アンピシリン添加 5 時間後の生菌数から persister 形成を判定した。その結果、Δ*yjjJ-hipA* および Δ*yjjJ-hipBA* 株が野生株に比べて強い感受性を示したことから、persister 形成には *yjjJ* および *hipA* 両遺伝子が重要であることが示唆された。現在、YjjJ および HipA の persister 形成での役割を解析中である。

persister, VBNC, toxin-antitoxin system

講演番号：2C17a08
講演日時：3 月 18 日 11:15～ C 校舎 17 会場

浸透圧ストレスで誘導される大腸菌のフロック形成機構の解析
Induction of the flocculation in *Escherichia coli*
○菅原 慶太[1]、早坂 俊亮[1]、浜本 晋[1]、井原 邦夫[2]、斎藤 浩美[3]、小林 弘[4]、魚住 信之[1]([1]東北大院工、[2]名大遺伝子実験施設、[3]帝京平成大院薬、[4]千葉大院薬)
○Keita SUGAWARA[1], Shunsuke HAYASAKA[1], Shin HAMAMOTO[1], Kunio IHARA[2], Hiromi SAITO[3], Hiroshi KOBAYASHI[4], Nobuyuki UOZUMI[1] ([1]Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., [2]Cent. Gene. Res., Nagoya Univ., [3]Fac. Pharm. Sci., Teikyo Heisei Univ., [4]Grad. Sch. Pharm. Sci., Chiba Univ.)

【背景】大腸菌は細胞外の浸透圧の変化に応答して様々な生体分子の活性を調節して環境変化に適応する．ところが，高濃度のイオンへの耐性機構に関わる生体分子において不明な点が多い．そこで，大腸菌における陰イオン耐性遺伝子の同定を試み，*cpxA*，*mrcB*，*cyaA* を候補遺伝子として報告した(2015 年日本生物工学会大会)．*cpxA*，*mrcB*，*cyaA* はそれぞれ二成分制御系のヒスチジンキナーゼ，細胞壁合成酵素，アデニル酸シクラーゼをコードしている．*cpxA* 欠損株および *mrcB* 欠損株を高濃度の塩ストレス下で培養すると，フロックと呼ばれる浮遊物を培養液中に形成した．微生物によるフロック形成は発酵技術や汚水浄化への応用が期待されるが，大腸菌のフロックの性質や形成機構の知見は少ない. 本研究では *cpxA* 遺伝子と *mrcB* 遺伝子に着目し, 大腸菌が形成するフロックの解析を行った．
【実験・結果】*cpxA* 欠損株および *mrcB* 欠損株を 250 mM NaCl と 250 mM KCl を含む高濃度塩ストレス下で一晩培養したところフロックを形成した．また，同条件において，野生株(BW25113)でも微量のフロック形成が確認された．フロックを Proteinase，DNase，Cellulase で処理することで構成成分の解析を行ったところ，フロックは Proteinase でのみ分解された．また，GFP を発現した大腸菌が形成したフロックを FM4-64 で染色し，共焦点顕微鏡観察を行ったところ，フロックが蛍光染色され，内部では GFP 蛍光が観察された. 以上の結果からフロックの主成分はタンパク質, および脂質膜であり, 内部には生菌の大腸菌が存在していることが示唆された．野生株，*cpxA* 欠損株および *mrcB* 欠損株を塩ストレス下で培養し，経時的に $OD_{600}$ 値とフロック形成量を測定することで，大腸菌の増殖ステージとフロック形成の関連性を検討した．野生株と *cpxA* 欠損株は培養開始から 15 時間以上経過した定常期の後半から死滅期にフロックを形成した。一方，*mrcB* 欠損株は培養開始から 4 時間程度の対数増殖期でフロックの形成が確認された．この結果から，野生株と *cpxA* 欠損株が形成するフロックには溶菌した菌が含有していることが示唆され，細胞膜由来の成分が多く含まれていることが推察された. そこで同条件において, 細胞膜の安定化を担う $Mg^{2+}$の存在下および非存在下でフロック形成量を検討した．その結果，野生株と *cpxA* 欠損株のフロック形成量は $Mg^{2+}$の存在下で減少したが，*mrcB* 欠損株では変化が見られなかった．これよりフロック形成には細胞膜の安定性が大きく関与し，細胞膜がフロックの主成分となる可能性が示唆された. *mrcB* 欠損株では細胞壁の構造が元より不安定であるため, $Mg^{2+}$の存在下でもフロック形成量が減少しなかったと考えられる．今後は、フロックの詳細な成分解析やフロック形成に関わるシグナル経路の探索を行う.

Flocculation, Cell-envelope, Two-component system

発表責任者：魚住　信之（uozumi@biophy.che.tohoku.ac.jp）

講演番号：2C17a09
講演日時：3 月 18 日 11:30～ C 校舎 17 会場

高浸透圧条件下における大腸菌機械受容チャネル YbdG の C 末端領域の機能解析
Functional analysis of the C-terminal region of mechanosensitive channel YbdG in *Escherichia coli* under hyperosmotic conditions.
○雨宮 駿[1]、豊田 隼斗[1]、浜本 晋[1]、鎌形 清人[2]、古田 忠臣[3]、井原 邦夫[4]、斎藤 浩美[5]、小林 弘[6]、魚住 信之[1] ([1]東北大院・工、[2]東北大院・多元研、[3]東工大・生命理工、[4]名大・遺伝子実験施設、[5]帝京平成大・薬、[6]千葉大院・薬研)
○Shun AMEMIYA[1], Hayato TOYODA[1], Shin HAMAMOTO[1], Kiyoto KAMAGATA[2], Tadaomi FURUTA[3], Kunio IHARA[4], Hiromi SAITO[5], Hiroshi KOBAYASHI[6], Nobuyuki UOZUMI[1] ([1]Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., [2]Grad. Sch. Sci., Tohoku Univ., [3]Sch. Life Sci. Tech., Tokyo Tech, [4]Cent. Gene. Res., Nagoya Univ., [5]Fac. Pharm. Sci., Teikyo Heisei Univ., [6]Grad. Sch. Pharm. Sci., Chiba Univ.)

【背景】機械受容チャネル(Mechanosensitive channel)は細胞膜に生じる張力を感知し活性化するチャネルタンパク質であり，低浸透圧ストレス下においてイオンや低分子物質を細胞外に排出することで細胞の膨張・破裂を防いでいる．近年，チャネルの構造変化にともない細胞質内のタンパク質と相互作用し，細胞分裂や細胞の形状維持に寄与する機械受容チャネルが報告され，浸透圧調節機能に加えて他の生理学的機能をもつ可能性が示唆された．大腸菌には 7 種類の機械受容チャネルが存在しているが，その多くが機能未知である．我々は大腸菌の機械受容チャネル YbdG の 167 番目の Ile 残基が Thr 残基に置換された変異チャネルを発現する大腸菌変異株(WTD731)が高濃度イオンストレス下において生育が抑制されることを報告した(第 65 回日本生物工学会大会)．本研究では大腸菌野生株(W3110)および WTD731 の表現型を比較することで YbdG の輸送活性および構造変化に及ぼす影響を検討し，YbdG の生理学的機能の解明を試みた．
【方法・結果】W3110，WTD731 および *ybdG* 欠損株(Δ*ybdG*)を 250 mM NaCl と 250 mM KCl を含む高濃度イオン培地を用いて生育実験を行ったところ，WTD731 のみ生育が抑制された．このことから I167T 変異は高濃度イオン環境下において大腸菌の生育を抑制する機能獲得型の変異であることが示唆された. 次に I167T 変異が YbdG の輸送活性に及ぼす影響を検討するため細胞内の $Cl^-$濃度を経時的に定量した．しかし W3110 と WTD731 の細胞内イオン濃度に有意差はみられなかった．さらにパッチクランプ法により各株の細胞膜のイオン電流を測定したが輸送活性に有意差はみられなかった。また，脱水による細胞収縮の影響を Stopped-flow 法により観察したが，W3110，WTD731 および Δ*ybdG* はいずれも同様の収縮傾向を示した．以上の結果から，I167T 変異は YbdG の輸送活性に影響を及ぼさないことがわかった．また，WTD731 は輸送活性以外の要因から高浸透圧ストレスに対して感受性を示すことが推測された．次に I167T 変異が YbdG の構造変化に及ぼす影響を検討するため，YbdG の細胞質に存在すると推測される C 末端領域(254-415 残基)に GST タグを付加した融合タンパク質を W3110 および WTD731 に過剰発現させて生育実験を行った．融合タンパク質を WTD731 に発現させた場合，高濃度イオンによる生育抑制が相補され，W3110 と同様の生育傾向を示した．このことから YbdG の C 末端領域は高浸透圧ストレスへの適応機構に関わることが示唆された．また，チャネル構造予測から I167T 変異は YbdG の 4 番目および 5 番目の膜貫通領域の間のループ構造に位置すると推測されることから C 末端領域の構造変化に影響を及ぼす可能性が示唆された．これらの結果から我々は YbdG が C 末端領域においてタンパク質と相互作用すると予想し，現在相互作用タンパク質の探索を行っている．

Mechaosensitive channel, YbdG, C-terminal region

講演番号：2C17a10
講演日時：3 月 18 日 11:45～ C 校舎 17 会場

大腸菌ペリプラズムタンパク質 YccT によるアミロイド線維形成抑制機構の解明
Characterization of the inhibitory mechanism of amyloid fiber formation by novel periplasmic protein YccT in Escherichia coli
佐野 晃太郎[1]、加藤 佑輝[1]、○小笠原 寛[2,3]（[1]信州大・院理工・応生、[2]信州大・基盤研究支援セ・遺伝子、[3]信州大・菌類・微生物ダイナミズム創発研究セ）
Kotaro Sano[1], Yuki Kato[1], ○Hiroshi Ogasawara[2,3] ([1]Appl. Biol., Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shinshu Univ., [2]Res. Center for Supports to Advanced Sci., Shinshu Univ., [3]Res. Center for Fungal and Microbial Dynamism, Shinshu Univ.)

大腸菌はバイオフィルム形成過程において菌体外多糖成分の他に、固体表面への付着や細菌細胞同士の凝集に関与する Curli と呼ばれるアミロイド線維を形成する。その構成タンパク質 CsgA をコードする遺伝子は、*csgBAC* オペロンを構成する遺伝子の一つとして発現され、その発現誘導には転写因子 CsgD が必須である。それら以外に CsgD は少なくとも 20 種類以上の遺伝子発現を直接制御することが明らかにされている(Ogasawara *et al.*, 2011)。最近、我々は CsgD 制御下遺伝子のうち、機能未知遺伝子 *yccT* が Curli 線毛形成抑制に関与することを見出した。CsgD 高発現下において、*yccT* と *csgA* 発現は共に増加していることから CsgA の自己重合体形成または細胞外への輸送が阻害されていることが示唆された。*In vitro* において YccT による CsgA 自己重合体形成への影響を確認したところ、YccT 濃度依存的に抑制されることが明らかとなった。また、細胞内では YccT 濃度依存的な *csgA* 発現量の低下も観察され、Curli 形成も阻害された。YccT 濃度依存的な CsgA 発現量低下に関わる分子機構の解明を目指し、RNA-seq により YccT 高発現下の全遺伝子発現の網羅的解析を実施した。その結果、発現量が著しく変動する遺伝子が複数個見出され、それら遺伝子発現に関与する転写因子の一つが、YccT 依存的な *csgA* 発現抑制に関与することを新たに見出した。本発表では、機能未知ペリプラズムタンパク質 YccT による Curli 形成阻害と、*csgA* 発現抑制の二つの役割について報告する。

biofilm, Escherichia coli, Amyloid fiber

講演番号：2C17p01
講演日時：3 月 18 日 14:00～ C 校舎 17 会場

*Paracoccus denitrificans* における細胞間コミュニケーションを介した凝集体形成抑制メカニズムの解明
Cell-cell communication represses the aggregation of *Paracoccus denitrificans*
○森永 花菜、豊福 雅典、尾花 望、野村 暢彦 (筑波大生命環境)
○Kana MORINAGA, Masanori TOYOFUKU, Nozomu OBANA, Nobuhiko NOMURA (Tsukuba Univ.)

多くの細菌はシグナルを介して情報伝達を行う。このシグナルを介した情報伝達機構は細胞間コミュニケーションと呼ばれており、細胞間でのシグナルの授受を介して遺伝子発現を変動させることで、一個体で存在するときとは異なる形質を示す。グラム陰性細菌において、最も頻繁に使用されているシグナルとして、アシル化ホモセリンラクトン（AHL）が挙げられる。AHL は炭素鎖が 4 から 18 の長さが存在し、細菌ごとに使用する炭素鎖の AHL が異なることが報告されている。特に長鎖の AHL は疎水性が高いことより、菌体から放出された場合に溶液中での拡散性が低く、他個体へ運搬されづらいと考えられている。このような長鎖 AHL を介した細胞間コミュニケーションにおいては、AHL はどのような方法で伝達し、さらにどのような遺伝子群を制御しているのか未解明な部分が多い。

グラム陰性細菌である *Paracoccus denitrificans* は、排水処理現場から頻繁に単離され脱窒能を有することから水処理において重要な役割を担う細菌として知られている。本菌は、炭素鎖が 16 の AHL(C16-HSL)を生産することが報告されている。そこで、本研究では *P. denitrificans* が C16-HSL を介して、どのような遺伝子群及び表現型を制御しているのかを明らかにすることを目的とした。まず、C16-HSL を介した遺伝子発現制御を明らかにするため、RNA-seq 解析により野生株とシグナル非生産株（Δ*pdnI*）の転写量を網羅的に比較した。その結果、Δ*pdnI* では野生株より転写量が上昇する遺伝子が 288 個、減少する遺伝子が 134 個存在することが明らかとなった。さらに、Δ*pdnI* は液体培養において野生株では観察されないような強凝集性を示した。また、Δ*pdnI* への遺伝子相補や C16-HSL の添加によって、野生株と同様に非凝集性を示すことも明らかとなった。このことより、*P. denitrificans* はシグナルを介して凝集体形成を抑制することが示唆された。続いて、シグナルを介した凝集体形成抑制がどのような遺伝子によって制御されているのかを明らかとするため、トランスポゾンを用いた解析を行った。Δ*pdnI* にトランスポゾンを挿入し、野生株のように非凝集性を示す株をスクリーニングしたところ、9,000 株のトランスポゾン挿入株のうち 23 株が非凝集性を示した。これらの株のトランスポゾン挿入部位を同定したところ、多くの株で推定多糖合成遺伝子にトランスポゾンが挿入されていた。このことより、*P. denitrificans* はシグナルを介して推定多糖合成遺伝子の発現量を調整することで、凝集体形成を抑制することが示唆された。今後は、*P. denitrificans* における細胞間コミュニケーション機構及び凝集体形成抑制機構の詳細な解析を行う。

cell-cell communication, aggregation, wastewater treatment

発表責任者：森永花菜（cocoawayappari76@gmail.com）

講演番号：2C17p02
講演日時：3 月 18 日 14:15～ C 校舎 17 会場

# 多様な AHL の応答に関与するセンサーキナーゼの同定とクオラムセンシングへの影響

# Identification of sensor histidine kinases related to responding to AHL and the effect to quorum sensing

○島村 裕子[1]、豊福 雅典[1]、諸星 知広[2]、池田 宰[2]、野村 暢彦[1]([1]筑波大・院生命環境、[2]宇都宮大・院工)
○Hiroko SHIMAMURA[1], Masanori TOYOFUKU[1], Tomohiro MOROHOSHI[2], Tsukasa IKEDA[2], Nobuhiko NOMURA[1] ([1]Univ. of Tsukuba, [2]Utsunomiya Univ.)

多くの微生物は低分子化合物であるシグナル物質を細胞外に生産し、互いにコミュニケーションを行うことが明らかとなっている。クオラムセンシングは微生物間コミュニケーションの一種であり、微生物がシグナル物質を介して一定の菌体密度に達したことを感知し、一斉に遺伝子発現、そして挙動を変化させるシステムである。最もよく知られているグラム陰性細菌のシグナル物質として、アシル化ホモセリンラクトン(AHL)がある。AHL には側鎖が様々な炭素数のものが存在し、各 AHL に対して特異的な AHL 受容体が対応する。*Chromobacterium violaceum* は土壌や水中に生息するグラム陰性細菌であり、*C. violaceum* ATCC 12472 株は側鎖の長さが異なる様々な長鎖 AHL に応答する。しかしながら、ATCC 12472 株において解明されている AHL 受容体は CviR のみであり、ATCC 12472 株がどのようなメカニズムで側鎖の長さが異なる様々な AHL に応答するのかは分かっていない。
本研究では、新たに 2 つのセンサーキナーゼが様々な側鎖長の AHL 応答に関与することを示し、それらがクオラムセンシングにどのように関与しているのか解析を進めてきた。前大会では 2 つのセンサーキナーゼと二成分制御系のペアであると推定されるレスポンスレギュレーターが AHL 応答に関与することまでを報告した。その後、2 つのセンサーキナーゼの各破壊株における一細胞レベルでの応答性の変化を解析したところ、一方のセンサーキナーゼ破壊株では応答性が均一に変化し、もう一方のセンサーキナーゼ破壊株では応答性が不均一に変化した。これらの結果から、*C. violaceum* は本研究で同定した 2 つのセンサーキナーゼを用いてクオラムセンシングの強弱や同調性を制御している可能性が示唆された。*C. violaceum* は既知の AHL 受容体 CviR に加えて 2 つのセンサーキナーゼを用いることでより多様な集団行動をとることが考えられる。

Quorum Sensing, acyl-homoserine lactone, two-component system

発表責任者：野村暢彦（nomura.nobuhiko.ge@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：2C17p03
講演日時：3 月 18 日 14:30～ C 校舎 17 会場

緑膿菌自然環境単離株における微生物間コミュニケーション機構の多様性
Diversity of cell-cell communication mechanism in environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*

○遠矢 正城[1]、豊福 雅典[1]、木暮 一啓[2]、野村 暢彦[1]([1]筑波大院・生命環境、[2]東大・大気海洋研)
○ Masashiro TOYA[1], Masanori TOYOFUKU[1], Kazuhiro KOGURE[2], Nobuhiko NOMURA[1] ([1]Tsukuba Univ., [2]Tokyo Univ.)

近年の研究では私たちの身の回りに存在する微生物もお互いにコミュニケーションをとることがわかってきている。Quorum sensing(QS)とは微生物間コミュニケーションの一つであり、シグナル物質を介して菌体密度を感知し様々な遺伝子の転写を調節する機構である。QS を行う代表的な細菌の一つである緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*)は免疫力の低下した患者や高齢者に対し日和見感染症を引き起こすことから、医療上問題視されてきた細菌である。またその優れた環境適応能力と遺伝的多様性から、動物体内に限らず植物や河川・湖沼、土壌など非常に幅広い自然環境中に分布している。近年では湾岸地域や外洋といった極限的な環境中からも単離され、それらが系統樹上で独自のクラスターを形成するなどその分布域の広さが報告されている。さらに自然環境中を介して感染症が引き起こされる可能性が示唆される報告もあることから、緑膿菌の自然環境中での動態は臨床的・生態的に重要であると言える。QS と緑膿菌の病原性は密接に関連していることがわかっており、今までに臨床由来の標準株を対象にそのメカニズムや制御方法が数多く研究されてきている。近年では標準株とは異なった QS システムを持つ臨床株も多数見つかっており、株間での多様性があることも報告されている。本研究においては前述の背景より、今までほとんど着目されてこなかった緑膿菌自然環境単離株の QS システムの多様性に着目し分子生物学的な解析を行った。具体的には河川や湖沼・海洋などの水環境中より単離された緑膿菌株に対して、QS 制御下にある病原性色素ピオシアニン及び、QS シグナル(3-oxo-$C_{12}$-HSL, $C_4$-HSL, PQS)の生産量の比較を行った。その結果、淡水や沿岸から分離された株はピオシアニン生産や QS シグナルの生産が顕著であり、外洋分離株ではそれらの生産量が PAO1 と比較して大きく減少する傾向が示された。さらに QS 関連遺伝子の配列を解読しアミノ酸配列を比較した結果、シグナルのレセプタータンパクやシグナル生合成酵素のアミノ酸配列が PAO1 と比べて異なっていることもわかった。今回新たに、QS シグナルの生産が見られなかった外洋分離株に対し外部シグナルへの応答性を確認したところ、株によって異なる応答性を示し QS におけるレセプタータンパクが機能していないことも示唆された。以上の結果から緑膿菌の QS システムは自然環境中の株間で多様性を持っており、異なる生息環境下においてコミュニケーション方法を巧みに変化させることでより順応していると考えられる。

*Pseudomonas aeruginosa*, cell-cell communication, environmental isolate

発表責任者：野村暢彦（nomura.nobuhiko.ge@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：2C17p04
講演日時：3 月 18 日 14:45～ C 校舎 17 会場

伸縮機能性高分子を用いた新規微生物制御法の開発
A new method to control bacterial communication by using an elastic polymer
○勝亦 雄太、豊福 雅典、UTADA Andrew S.、小川 和義、野村 暢彦（筑波大院　生命環境系）
○Yuta KATSUMATA, Masanori TOYOFUKU, Andrew S. UTADA, Kazuyoshi OGAWA, Nobuhiko NOMURA (Tsukuba Univ.)

実環境中の微生物の多くはバイオフィルムのような集団を形成して存在する．近年では，このような集団中では微生物が互いにコミュニケーションを行うことが明らかとなってきた．なかでも Quorum Sensing (QS)と呼ばれるコミュニケーションは，微生物の呼吸や毒素生産，抗生物質耐性といった多くの活性を調節しているため，多くの産業分野でその制御の重要性が意識されている．これまでの報告から QS は菌体密度依存的なシステムだと考えられており，菌体密度を意図的に調節することで発現制御が可能だと推察される．そこで本研究では，温度応答性高分子の伸縮運動を利用して菌体密度を調節することにより，QS 制御が可能かどうか検証を行った. 菌体密度を制御する高分子素材として poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPA)に着目した. PNIPA は 32℃を境に伸縮する性質を持つため, 微生物を包括させた PNIPA 担体に温度変化を与えることで菌体密度を制御できると考えた.

まず，QS モデル細菌である緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (野生株)を包括した PNIPA 担体を異なる温度条件で培養し，包括菌体の増殖を観察した．結果，収縮した PNIPA 担体では菌体数が増加することが分かった．この菌体数の増加に QS が関与するか確かめるため，続いて Δ*lasI*Δ*rhlI* (シグナル物質非生産株)を用いて同様の実験を行った．その結果，シグナル物質非生産株では野生株に見られた菌体数の増加は観察されなかった．また，体積変化を伴わない高分子 polyacrylamide を用いた系においては，野生株，シグナル物質非生産株のいずれでも菌体数の増加は観察されなかった.

以上の結果から，収縮した PNIPA 担体が作り出す高い菌体密度条件が，*P. aeruginosa* の QS 発現を誘導し，何らかの機構で菌体数の増加を促していることが示唆された．本研究により，温度応答性高分子を用いて菌体密度を調節することで，QS 制御が可能となることが示唆された．現在はシグナル物質のレポーター株を包括したマイクロゲルを作製し，菌体密度と QS 発現の関係性について定量的な解析を進めている.

Pseudomonas aeruginosa, cell-cell communication, polymer

講演番号：2C17p05
講演日時：3 月 18 日 15:00～ C 校舎 17 会場

バイオフィルム内部における自然突然変異株出現機構の解析
Spontaneous mutation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms
○伊澤 徹[1]、豊福 雅典[2]、清川 達則[3]、楊 佳約[3]、尾花 望[2]、野村 暢彦[2] ([1]筑波大生命環境、[2]筑波大生命環境系、[3]筑波大院生命環境科学)
○Toru Isawa[1], Masanori Toyofuku[2], Tatsunori Kiyokawa[3], Jiayue Yang[3], Nozomu Obana[2], Nobuhiko Nomura[2] ([1]College of Agrobiological Resource Sciences, University of Tsukuba, [2]Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, [3]Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba)

実環境中において多くの微生物は浮遊状態ではなくバイオフィルムと呼ばれる集団構造体を形成している。バイオフィルムとは微生物集団と細胞外高分子物質からなる三次元構造体のことである。バイオフィルム内部は栄養や酸素の濃度勾配や代謝産物の蓄積が見られ、外部環境とは異なる環境条件であることが知られている。このようなバイオフィルム内部のストレス環境は自然突然変異株の出現を誘発すると予想されており、実際にバイオフィルム内部では自然突然変異株の出現頻度が飛躍的に上昇することが報告されている。バイオフィルム内部で出現した自然突然変異株は様々な表現型を有するようになることから、自然突然変異株の出現はバイオフィルムの環境適応機構の一種であると考えられている。一方でバイオフィルム内部における自然突然変異株出現の詳細な機構や、その出現とバイオフィルム構造の関連性は未だ明らかにされていない。本研究ではバイオフィルムのモデル細菌として使われる緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)を用いて、バイオフィルム三次元構造中における自然突然変異株の局在性を時空間的に解析することで、バイオフィルムの内部環境と自然突然変異株の出現との関連性について明らかにすることを目的とした。

バイオフィルム内部における自然突然変異株の出現には修復系遺伝子の *recA* が関与することが報告されている。そこでバイオフィルム中における *recA* の発現の局在性と自然突然変異株の出現の関連を解析するため、*recA* プロモーターレポーター株（P*recA*-*egfp*）を作製した。本株は DNA 損傷誘導剤であるマイトマイシン C に応答して緑色蛍光の増加することから、*recA* のレポーター株として機能することが示された。また、本レポーター株を用いてバイオフィルムを形成させ、蛍光顕微鏡によって観察したところ、バイオフィルム内部の一部細胞で *recA* が高発現しており、自然突然変異株の出現には局在性がある可能性が考えられた。現在、本レポーター株を用いてバイオフィルムの構造およびその内部を時空間的に観察することによって、*recA* が関与する自然突然変異株出現について解析を進めている。

*Pseudomonas aeruginosa*, Biofilm, Spontaneous mutation

発表責任者：野村 暢彦（nomura.nobuhiko.ge@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：2C17p06
講演日時：3 月 18 日 15:25～ C 校舎 17 会場

# Clostridiales 目細菌ゲノムにコードされる *agr* 様クオラムセンシング系自己誘導ペプチドの LC-MS/MS 検出系の確立

# LC-MS/MS detection of quorum sensing peptides encoded in *agr*-like gene clusters of Clostridiales

神川 美樹[1]、安達 桂香[1]、大久保 謙一[1]、大谷 郁[2]、岡 健太郎[2]、園元 謙二[1]、○中山 二郎[1]([1]九大院農、[2]ミヤリサン製薬)
Miki Kamikawa[1], Keika Adachi[1], Kenichi Okubo[1], Kaori Otani[2], Kentaro Oka[2], Kenji Sonomoto[1], ○Jiro Nakayama[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Miyarisan Pharma. Co., Ltd.)

【背景・目的】多くの細菌には、自己誘導因子と呼ばれる化学物質を介して細胞間コミュニケーションをとり集団的行動を起こすクオラムセンシング（quorum sensing, QS）機構が存在する。低 GC グラム陽性細菌には、黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* にみられる環状チオラクトンを自己誘導ペプチド（autoinducing peptide, AIP）とする *agr* QS 系の遺伝子クラスターオルソログが幅広く存在し、病原因子遺伝子など多様な遺伝子発現を制御していることが示唆されている。なかでも Clostridiales 目細菌は、動物腸管や環境中に広く多岐に存在し、生態系において重要な機能を有する点で注目されており、Clostridiales 目細菌群の AIP の構造とそれらが制御する QS には大いに興味が持たれる。しかしながら、AIP は非常に低濃度で生産される上、種または株特異的な構造を有するため、同定が困難でありその実態が確認されていないものがほとんどである。そこで本研究では、検出感度及び特異性に優れる LC-MS/MS を用いた Clostridiales 目細菌群 AIP の網羅的検出系の構築を目指した。
【方法・結果】まず、LC-MS/MS 分析の前処理として、培養液上清の溶媒抽出を検討した。AIP のモデルペプチドとして、ウェルシュ菌 *Clostridium perfringens* の AIP アナログ（CLWFS-thiolactone）を tryptone soytone fluctose（TSF）培地に添加し、条件検討を行った。種々の抽出溶媒を検討した結果、酢酸エチル：メタノール（99：1）を用いて 2 回溶媒抽出を行った場合、添加したペプチドの大部分が有機相に回収されることが明らかとなり、本有機溶媒抽出が AIP の検出に適していると判断された。また、*C. perfringens* の AIP 合成品（CLWFT-thiolactone）を用いて LC-MS/MS でのフラグメントパターンを確認したところ、直鎖状となった AIP の 3 残基目 W と 4 残基目 F の間で切断された $m/z$ = 403 がメインピークとして得られた。したがって、プレカーサーイオンを $m/z$ = 651、プロダクトイオンを $m/z$ = 403 として、multi-reaction monitoring（MRM）モードにより培養液粗抽出物中の AIP 検出を試みた。*C. perfringens* strain 13 を TSF 培地にて 37 ℃で培養し、経時的に培養液上清を回収し、酢酸エチル：メタノール（99：1）を等量添加して溶媒抽出を行った。抽出物を真空乾燥後、上記 MRM モードにより AIP 由来イオンの検出を行った。その結果、対数増殖中期から AIP が検出され始め、定常期初期に 8.3 nM に達し、その後徐々に減少していくことが判明した。現在、構築した検出系を用いて他の Clostridiales 目細菌 AIP の検出を試みている。

quorum sensing, Clostridiales, autoinducing peptide

発表責任者：中山二郎（nakayama@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：2C17p07
講演日時：3 月 18 日 15:40～ C 校舎 17 会場

*Clostridium perfringens* の内在性クオラムクエンチング―代謝同調的 pH 低下によるクオラムセンシング機構の抑制―
Self-quorum quenching of *Clostridium perfringens*；Metabolic-linked pH drop suppresses toxin productions
○安達 桂香[1]、神川 美樹[1]、Ravindra Pal Singh[1]、大谷 郁[2]、園元 謙二[1]、中山 二郎[1]([1]九大院・農、[2]ミヤリサン製薬)
○ Keika ADACHI[1], Miki KAMIKAWA[1], Pal Singh RAVINDRA[1], Kaori OHTANI[2], Kenji SONOMOTO[1], Jiro NAKAYAMA[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Miyarisan Pharma Co., Ltd.)

〔背景〕ウエルシュ菌 *Clostridium perfringens* の毒素生産は、VirSR 二成分制御系（VirSR TCS）を介した *agr* 様クオラムセンシング（QS）により制御されている。本菌の QS シグナルはチオラクトン環構造を有する自己誘導性ペプチド（AIP）であり、AIP が VirSR TCS に感知されることで複数の病原性遺伝子の発現が誘導される。一方、*C. perfringens* strain 13 の定常期培養液上清を QS 誘導期菌体（対数増殖期初期）に添加することで、VirSR TCS に直接的制御を受けている毒素遺伝子 *pfoA* の転写物が消失する現象が知られ、本菌に自身の QS を下方修正する内在性クオラムクエンチング（QQ）機構が備わっていることが示されている（2016 年度日本農芸化学会、ポスター番号 4F071）。本研究では、*C. perfringens* の QQ 誘導条件および作用機作を詳細に調査し、その機序解明を行った。
〔方法・結果〕まず、*C. perfringens* strain 13 における増殖と QS と QQ の関係について調べた。QS と QQ については VirSR TCS により直接転写制御を受ける毒素遺伝子 *pfoA* を逆転写リアルタイム PCR により定量した。同時に、培養液中の AIP を LC-MS/MS で検出した。その結果、*pfoA* の転写は対数増殖期中期に最大になり、その後、培養液が酸性化するとともに速やかに消失することが判明した。AIP の生産は対数増殖期中期に最大になったが、その後徐々に消失していった。*pfoA* の消失は有機酸あるいは塩酸の添加でも同時に起こることより、発酵生産された有機酸による pH の低下が直接的な QQ の引き金となっていることが示された。また、RNA 合成阻害剤であるリファンピシンを添加すると、同様に *pfoA* の速やかな消失が観察されることから、*pfoA* は通常非常に早い速度で分解されており、QS による転写誘導が何らかの機構により停止することで一気に消失することが示唆された。最後に、*pfoA* 以外の VirSR TCS 制御下の遺伝子についても QQ による転写抑制効果を解析した、その結果、*pfoA* と同様に VirSR TCS に直接的制御を受けている遺伝子 *virT*、*virU* の転写は下方制御された。しかし、間接的制御を受けている毒素遺伝子 *plc* は影響を受けなかった。現在 VirSR TCS 制御下になる他の遺伝子についても解析中である。以上より、*C. perfringens* には、代謝による有機酸の蓄積がもたらす細胞外 pH の低下により QS が遮断され、VirSR TCS 制御下の一連の毒素遺伝子の発現が停止するシステムが備わっていることが判明した。

*Clostridium perfringens*, quorum quenching, toxin regulation

発表責任者：中山二郎（nakayama@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：2C17p08
講演日時：3 月 18 日 15:55～ C 校舎 17 会場

細菌の情報伝達レギュロン・メンバー間でのシグナル依存的エピスタティック相互作用
$Fe^{3+}$-dependent epistasis between the CpxR-activated loci and the PmrA-activated LPS modification loci in *Salmonella enterica*.
○加藤 明宣、東野 奈美、内海 龍太郎（近大農）
○Akinori KATO, Nami HIGASHINO, Ryutaro UTSUMI (Kindai Univ.)

細菌は、類似のストレスに対し複数の情報伝達機構により応答適応する。サルモネラ菌において、二成分制御系の PmrA/PmrB は、高 $Fe^{3+}$/低 $Mg^{2+}$条件等で、カチオニックな抗菌剤のポリミキシン B に抵抗性を付与する。PmrA/PmrB 系での $Fe^{3+}$シグナル感知と細胞表層のリポ多糖のピロリン酸状態の制御によるシグナル･キャンセリング機構はよく理解されている（Kato A et al. ***Mol Cell*** 2012）。一方、CpxR/CpxA 系は、様々なストレス条件により活性化され、種々の表現型を示すことから、より複雑である。本研究では、これらのレギュロン間における遺伝子相互作用の解析から、CpxR/CpxA 系の新たな側面を示す。この系の制御下にある *degP* および *yqjA* 遺伝子の欠損は、サルモネラ菌のリポ多糖のリピド A のピロリン酸状態を変化させる PmrA 依存的遺伝子産物が欠失した遺伝的バックグラウンドにおいてのみ、鉄感受性の表現型に寄与する。よって、サルモネラ菌においては、PmrA/PmrB 系による $Fe^{3+}$依存的な細胞表層ピロリン酸化状態制御を第 1 の階層とし、CpxR/CpxA 系は第 2 の階層として、鉄ストレスへの応答適応においても機能することが明らかとなった。

two-component system, genetic interaction, *Salmonella*

発表責任者：加藤 明宣（kato_a@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：2C17p09
講演日時：3 月 18 日 16:10～ C 校舎 17 会場

病原菌エフェクターの膜局在化に依存した活性化機構の解析
"A plant pathogen effector, RipAA"-causes growth inhibition that is stimulated through membrane localization and subsequent phosphorylation in yeast.
○北囿 喬斗、忻 詩博、田中 直孝、田淵 光昭（香川大農）
○Takato KITASONO, Subo SHIN, Naotaka TANAKA, Mitsuaki TABUCHI (Kagawa Univ.)

植物やヒトに感染する病原性のグラム陰性菌は、Ⅲ型分泌装置と呼ばれる注射針様の構造物を介して、エフェクターと呼ばれるタンパク質を宿主細胞内に直接注入しており、これらのエフェクターは宿主内の様々な生理機能を撹乱することで感染を成立させている。エフェクターの分子機能の解明は病原菌の感染戦略を理解する上で重要であるが、未だに多くのエフェクターの分子機能については明らかにされていない。我々は、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 発現系を用いて、機能未知な青枯病菌エフェクターRipAA が酵母に増殖阻害を引き起こすことを見いだした。さらに GFP の蛍光を指標として RipAA の細胞内局在を解析したところ、RipAA は酵母の娘細胞膜に特異的に極性輸送されていた。我々は、これらの観点から RipAA の詳しい機能の解明を試みた。

まず始めに、RipAA 分子内の機能ドメインを同定するため、N、C 末端アミノ酸における各種欠損体を作製し、その酵母増殖阻害活性と膜局在に関わる機能ドメインについて解析した。その結果、N 末端には膜局在ドメイン及び自己阻害ドメインが、C 末端には増殖阻害活性ドメインが存在しており、それぞれが独立して機能していることが明らかになった。

次に、膜局在性タンパク質 Psr1 の融合変異体がパルミトイル化によって膜に強制的に移行するという報告をもとに RipAA の膜局在性と増殖阻害活性の関係性を明らかにした。

また、RipAA は酵母内で高度にリン酸化されていた。そこで、キナーゼの温度感受性株を用いた実験を行い、CK1(カゼインキナーゼ１)の酵母ホモログを酵母内における RipAA のキナーゼ候補として同定した。

さらに我々は、膜局在化によるリン酸化が RipAA 活性化の原因であると考え、その仮説を検証するために、RipAA の推定リン酸化アミノ酸残基をアラニンに置換した非リン酸化変異体を作製した。この変異体はリン酸化状態が低下しており、それに伴って増殖阻害も回復していた。このことから、リン酸化が RipAA 活性化に重要であることが示唆された。

興味深いことに、構造予測サイトを用いた解析から RipAA はある種のシステインプロテアーゼと低い相同性が確認された。そこで、RipAA 内で対応する触媒残基に変異を加えたところ増殖阻害の回復が観察された。この結果から、RipAA は酵母内で酵素活性を示し、未知の基質を標的とすることで増殖阻害を示すことが示唆された。そのため、この酵素活性の有無と未知の基質の探索を行うことで、RipAA の宿主内での機構が明らかになることが考えられる。

membrane targeting, effector, Saccharomyces cerevisiae

講演番号：2C17p10
講演日時：3 月 18 日 16:25～ C 校舎 17 会場

永生細胞高出現変異株の抗菌剤耐性能評価と変異領域の解析
Evaluation of resistances of high-persister-cell-forming mutants to antimicrobial agents and analyzing their mutations.
○紅谷 貴之[1]、金本 真治[2]、永村 光一[2]、御厨 真幸[1]、松村 吉信[2,3] ([1]関大院・生命生物工、[2]関西大・生命生物工、[3]関西大・ORDIST)
○ TAKAYUKI BENITANI[1], SHINJI KANAMOTO[2], KOUICHI NAGAMURA[2], MASAYUKI MIKURIYA[1], YOSHINOBU MATSUMURA[2,3] ([1]Grad. Sch. Kansai Univ., Dept. Life Science & Biotechnol., [2]Kansai Univ., Dept. Life Science & Biotechnol., [3]Kansai Univ., ORDIST)

〔目的〕公衆衛生や清潔志向への関心の高まりから、高い安全性と抗菌力をあわせもった抗菌剤の開発が望まれる。一方で、近年、胞子とは異なる抗菌剤耐性の高い休眠型細胞である永生細胞(persister cell)が確認され、この永世細胞を出現させないことも耐性菌に対する対応とともに求められている。これまでの我々の研究で、抗菌性陽イオン性界面活性剤である臭化セチルトリメチルアンモニウム塩(CTAB)に耐性を示す自然突然変異株 *Escherichia coli* OW66 株が単離され、スーパーオキシドストレス耐性に関わる遺伝子に変異が生じ、耐性化していることを見出している。また、これとは別に CTAB 耐性度の異なる複数の変異株を取得し、その一部に永生細胞を高頻度で形成する変異株が含まれていることを見出した。そこで本研究では永生細胞の抗菌剤耐性能評価と高頻度出現に関わる遺伝子領域の解析を試みた。
〔方法〕最小発育阻止濃度(MIC)の測定は CTAB を含む培地で培養後、目視により増殖の有無で判定し、最小殺菌濃度(MBC)の測定は CTAB を含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で細胞を処理し、L 培地での増殖の有無を目視で判定した。永生細胞は、100μM CTAB での 30 分間処理後の生残細胞とし、永生細胞の抗菌剤耐性は抗菌剤処理後の生残細胞数変化で評価した。CTAB 耐性変異株の変異部位同定は次世代シーケンサーMiSeq(illumine 社)を用いた。スーパーオキシドの発生確認は CTAB 耐性変異株を 20μM CTAB 処理後、スーパーオキシド特異的蛍光プローブを用いて観察した。
〔結果〕CTAB 耐性変異株は好気条件での CTAB 含有培地で増殖できる株として複数単離され、これらの変異株は野生株に比べて MIC も MBC も高かった。50μM CTAB 含有 L 培地で増殖可能な L-50 株と終濃度 200μM CTAB 含有 L 培地で増殖可能な L-200 株の対数増殖期後期細胞の永生細胞出現割合を確認した結果、L-50 株は約 0.01%の細胞が永生細胞に変化したのに対し、L-200 株では約 1%の高い割合で永生細胞に変化し、永生細胞の CTAB 耐性を調査した結果、CTAB 処理後の D 値が 40 分であり、栄養細胞の D 値の約 10 倍であった。CTAB 耐性変異株の変異部位を調査した結果、*yaeT*(*BamA*)、*infA*、*msbA*、*marR*、*sohA* に変異が生じていた。特に、*sohA* は永生細胞形成に関わるとされる antitoxin 遺伝子であり、この遺伝子の不活化は toxin の活性化につながり、永生細胞の誘導につながると予想される。CTAB 処理時のスーパーオキシド発生を確認した結果、OW66 株と異なり、L-50 株と L-200 株共にスーパーオキシドの発生が確認され、これらは OW66 株と異なる耐性要因を有していると予想される。今後は *sohA* 変異が永生細胞形成に及ぼす影響や活性酸素発生の原因調査を行う予定がある。

antibacterial agents, persister cell, reactive oxygen species

発表責任者：松村吉信（ymatsu@kansai-u.ac.jp）

講演番号：2C17p11
講演日時：3 月 18 日 16:50～ C 校舎 17 会場

酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* NBRC 3283 株における Dps ホモログの機能解析
Functional analysis of Dps homolog in *Acetobacter pasteurianus* NBRC 3283
○宮平 響子、石川 森夫、鈴木 敏弘、勝木 浩平、松原 拓哉、貝沼（岡本） 章子（東京農大・応生科・醸造）
○Kyoko Miyahira, Morio Ishikawa, Toshihiro Suzuki, Kohei Katsuki, Takuya Matsubara, Akiko Okamoto-Kainuma (Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. Agric.)

【目的】食酢醸造に用いられる酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* はエタノールを細胞膜上の脱水素酵素によって酢酸に不完全酸化し（酢酸発酵）、さらに、生成した酢酸を細胞内で完全酸化する（酢酸過酸化）二つのエネルギー生成系を有する絶対好気性菌である。本菌の電子伝達系の駆動時には、電子の授受に付随した活性酸素種（ROS）の発生が予測されるため、演者らはこれらに対する応答機構の解明を進めており、これまでに、酢酸過酸化時における著量の ROS の蓄積、および superoxide dismutase・カタラーゼ等の ROS 除去系酵素の高発現を報告している。加えて、大腸菌において ROS 耐性への関与が報告されている Dps のホモログが高発現するという知見も得ており、[2)]本研究では本因子の機能解析を行ったので報告する。
【方法および結果】*A. pasteurianus* NBRC 3283 株を供試し、本菌 Dps の機能について検証を行った。プラスミド DNA（pUC119）を本 Dps ホモログの共存下で $H_2O_2$ と $Fe^{2+}$に暴露した結果、本因子は大腸菌 Dps とは異なり、DNA への結合能は示さなかった。一方で、同条件下におけるプラスミド DNA の低分子化は確認されなかったことから、本因子はヒドロキシラジカルの発生による DNA の酸化障害に対して防御的な作用を示すことが示唆された。本因子への $Fe^{2+}$の添加試験を行ったところ、Dps Ferroxidase center の形成を示す 305 nm の吸光度の上昇が観察されたため、本因子は二価鉄イオンを三価に酸化した上で分子内に保持し、これにより Fenton 反応を抑制してヒドロキシラジカルの発生を防ぐ作用を持つことが強く推測された。本菌 *dps* 遺伝子の破壊による影響について検討した結果、*dps* 破壊株は酢酸過酸化期において顕著な $H_2O_2$感受性を示し、親株と比較して、菌体内に高い $Fe^{2+}$の蓄積が観察された。以上のことから、本菌 Dps は細胞内の $Fe^{2+}$を減少させ、細胞内で生じる Fenton 反応を阻害することで、酢酸過酸化期における菌体に ROS 耐性を付与している可能性が示唆された。
1）勝木ら：第 66 回 日本生物工学会大会講演要旨集，p. 61（2014）.
2）松原ら：日本農芸化学会 2015 年度大会講演要旨集，2A21p07（2015）.

*Acetobacter pasteurianus*, Dps, ROS tolerance

発表責任者：貝沼（岡本）章子（okamoto@nodai.ac.jp）

講演番号：2C17p12
講演日時：3 月 18 日 17:05～ C 校舎 17 会場

紅藻ガルデリアの糖添加による葉緑体白化・再緑化現象の解析
Study on breaching of *Galdieria sulphuraria* by addition of sugar
○宮澤 和己[1]、重信 直人[1]、兼崎 友[2]、渡辺 智[1]、吉川 博文[1] ([1]東農大農、[2]東農大 ゲノムセンター)
○Kazuki MIYAZAWA[1], Naoto SIGENOBU[1], Yu KANESAKI[2], Satoru WATANABE[1], Hirohumi YOSHIKAWA[1] ([1]Nodai Univ., [2]NODAI Genome Research Center)

紅藻イデユコゴメ綱はシゾン、シアニジウム、ガルデリアの３属からなる。 これら３属は単細胞性で温泉のような高温、強酸性、重金属イオン存在下という類似した環境中に棲息するが、細胞形態、ゲノム配列、分裂様式、栄養的分類など多くの点で異なる。 例えば、シゾン、シアニジウムは完全光独立栄養増殖をおこなうが、ガルデリアは光独立栄養増殖よりグルコースを始めとする多種の外来糖を資化する従属栄養増殖を優先し、その際に葉緑体が白化する。 我々は、高温酸性温泉から新規単離した *Galdieira sulphuraria* SG 株について、従属栄養培養の可否などを調べた。この新規単離株において光照射下でもグルコースの添加により従属栄養増殖が可能で、数日間で葉緑体が白化しクロロフィル含量が低下することを確認した。さらに遺伝子発現レベルへの影響を調べたところ、グルコース添加３時間でも色素体関連遺伝子の転写産物量が減少しており、グルコースの検知はかなり短時間で起こることが分かった。また過去の知見でガルデリアはグルコース以外にも様々な糖を資化できることが知られており、SG 株にもグルコース以外の単糖を添加したところ、糖の種類によって葉緑体の白化の度合いに違いが見られることも分かった。現在も葉緑体の白化メカニズムについて研究を進めている。
さらに、当研究においてグルコースを添加しても白化しない突然変株を獲得した。野生株はグルコース消費後も長期間白化状態を保つが、この変異株はグルコース消費中にはクロロフィル量の減少が起こるが、グルコース消費後すぐにクロロフィル量が回復することが分かった。これら結果から、野生株と変異株はグルコース消費後の細胞応答に違いがあると予想された。そこで、グルコース消費後の遺伝子発現に違いがあるかを調べるため、グルコース消費後の様々な光合成関連遺伝子の発現を RT-PCR やトランスクリプトーム解析により検証した。その結果、転写産物量のレベルでも野生株と変異株の表現型に対応した発現パターンの変化が観測できた。また、顕微鏡観察やフィルターを用いた実験もおこなった結果、培養上清中の有機物や多糖の資化能に違いがあることが明らかとなった。

chloroplast differentiation, heterotroph, red algae

講演番号：2C17p13
講演日時：3 月 18 日 17:20～ C 校舎 17 会場

シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC7942 における ParA 様タンパク質の機能解析
ParA like protein mediates the distribution of multi-copy chromosomes in cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942.

○渡辺 智[1]、野田（大林） 明日翔[1]、内桶 香那[1]、大林 龍胆[2]、兼崎 友[3]、千葉櫻 拓[1]、吉川 博文[1]（[1]東京農大・バイオ、[2]遺伝研・細胞遺伝、[3]東京農大・NGRC）
○ Satoru WATANABE[1], Aska Noda-Ohbayashi[1], Kana Uchioke[1], Ryudo Ohbayashi[2], Yu Kanesaki[3], Taku Chibazakura[1], Hirofumi Yoshikawa[1] ([1]Dept. Biosci., Tokyo Univ. Agric., [2]Natl. Inst. Genet., [3]NGRC, Tokyo Univ. Agric.)

枯草菌、大腸菌は 1 細胞当たり 1 コピーの染色体を有するのに対し、原核藻類であるシアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942（以下 *S.* 7942）は細胞当たり 3-5 コピーの染色体を保持している。我々は複数コピーの染色体の複製機構について研究を行っており、これまでに *S.* 7942 の光依存的な複製開始機構を明らかにした (Watanabe et al., *Mol. Microbiol.*, 2012; Ohbayashi et al., *FEMS Microbiol Lett.*, 2013; Watanabe et al., *Pros One,* 2015; Ohbayashi et al., *ISME J*, 2016)。近年、蛍光タンパク質を用いた解析から複数コピーの染色体は桿菌である *S.* 7942 の細胞長軸上に沿って均等間隔に分布することが示された (Jain et al., PNAS, 2012; Chen et al., ProS One, 2012)。炭酸固定に関わるタンパク質複合体カルボキシソームも複数コピー染色体と類似した分布を示し、この分布は ParA タンパク質によって制御される (Savage et al., Science, 2008)。ParA はプラスミドの分配因子として同定された ATPase ファミリータンパク質であり、細胞分裂を制御する MinD タンパク質とも高い相同性を示す。本研究では *S.* 7942 の ParA に着目し、複数コピー染色体の細胞内分布および細胞分裂に対する機能を解析した。

複数コピー染色体の細胞内分布を解析するために、Fluorescence *in situ* hybridization (以下 FISH) 法による染色体の観察法を確立した。染色体の複製開始点 *ori* の近傍領域をラベルし顕微鏡下で観察すると、*ori*-foci は細胞長軸に沿って分布し、foci の数は DNA 含量と一致した。次に *parA* 遺伝子の破壊株を作製し、FISH 法を用いて染色体の分布を解析した。その結果、野生株と比較して破壊株の *ori*-foci の数が有意に減少した。細胞内の DNA 含量は野生株と同等であったことから、*parA* 破壊株では染色体の分布異常が起こっていると考えられた。*parA* を相補することで、この染色体の分布異常は回復したことから *parA* が *S.* 7942 の染色体分布に関わることが明らかとなった。しかし、*parA* 破壊株は通常培養下における生育は野生株と同程度であり、細胞分裂に対する影響は確認されなかった。これまでに *S.* 7942 において MinD を過剰発現すると分裂異常を示しフィラメント状の形態が観察されることが示されている（Miyagishima et al., *Mol. Microbiol.*, 2005）。そこで ParA を過剰発現した際の細胞増殖への影響を解析した。染色体上のニュートラルサイトで IPTG 依存的に ParA を誘導発現する株を構築し、細胞形態や DNA 含量を測定すると、ParA を過剰発現によって細胞が肥大化し DNA を高蓄積することが明らかとなった。培養液の濁度は非誘導時と同様であることから、ParA の過剰発現により細胞の分裂のみが阻害されていると考えられる。これらは MinD 過剰発現とは明らかに異なる表現型であり、ParA が MinD とは異なる経路で細胞分裂に関与すると考えられる。ParA のさらなる機能を明らかにするため、現在 ParA と相互作用する因子について解析中である。

proliferation, chromosome distribution, cell division

発表責任者：渡辺智（s3watana@nodai.ac.jp）

講演番号：2C17p14
講演日時：3 月 18 日 17:35～ C 校舎 17 会場

シアノバクテリアにおける新規高温耐性株の取得とリシーケンス解析
Resequece analysis of high temperature tolerant mutants of *Synechococcus elongatus* PCC 7942.
○兼崎 友[1]、樋山 智恵美[2]、小澤 啓吾[2]、宮澤 和己[2]、渡辺 智[2]、吉川 博文[2]([1]東京農大ゲノムセンター、[2]東京農大バイオ)
○Yu KANESAKI[1], Chiemi Hiyama[2], Keigo Ozawa[2], Kazuki Miyazawa[2], Satoru Watanabe[2], Hirofumi Yoshikawa[2] ([1]NGRC, Tokyo Univ. Agric., [2]Tokyo Univ. Agric.)

*Synechococcus elongatus* PCC 7942 は常温性のシアノバクテリアであり、その生育上限温度は 43℃であるが、研究室株により差異が存在する。これは継代培養中に生じた突然変異によるものと考えられる。我々は、全ゲノムリシークエンス解析により研究室株間の固有の変異を明らかにし、変異箇所の相補実験をおこなうことで、高温感受性を示す研究室株の原因変異が DNA ヘリカーゼをコードする *dnaB* 遺伝子への点突然変異によるものであることを明らかにした。

一方、44℃以上の高温条件に曝すと、野生株であっても分裂異常によりフィラメント状になり細胞増殖の抑制が観測される。また僅か 20 分間、50℃に曝しただけでも細胞の生存率は 50%まで低下する。これまでにシアノバクテリアにおいて、HspA, HtpG, DnaK, DnaJ, GroESL などの熱ショックタンパク質群や Hik34, HrcA などの遺伝子発現制御因子が見つかっているが、遺伝子組換え実験系を用いても 45℃以上での連続培養に成功した例はない。一般的に常温性の微生物は 45℃を超えると生育できず(Bergey (1919) J. Bacteriol.)、至適生育温度が 45℃以上、あるいは生育限界温度が 55℃以上の微生物は「好熱菌」と呼ばれる。一方でシアノバクテリアの中には、*Thermosynechococcus* のように温泉から単離された至適生育温度 57℃の好熱性の種も存在しており、どのような遺伝的形質が常温性と好熱性のシアノバクテリアを隔てているのかはよく分かっていない。

そこで我々は、全ゲノムリシーケンス解析により完全ゲノム情報を把握した *S. elongatus* PCC 7942 TUA 株をベースに、高温順化を繰り返しながら長期培養をおこない、「45℃の壁」を超える突然変異株を単離できるかどうか試みた。BG-11 寒天培地上で生育上限温度での培養をおこないつつ、定期的に 6 時間程度、1℃高い培養温度に曝す処理を繰り返した結果、培養開始より 2 ヶ月の段階で 45℃、4 ヶ月の段階で 48℃、そして 8 ヶ月の段階では 50℃もの高温での連続培養が可能な突然変異株が取得できた。この株を全ゲノムリシーケンス解析した結果、これまでに高温耐性との関わりが報告されていない複数の遺伝子座への変異を発見した。一方、この株は液体 BG11 培地、1% CO2 通気下での培養時には 47℃までしか生育できなかった。現在、分子生物学的手法により高温耐性の獲得に寄与した遺伝子座の同定を進めている。

このような自然突然変異の累積により得られる適応進化株は、遺伝子組換えによらない微生物育種法として藻類・微生物によるバイオマス物質生産にも応用可能であるため、現在、さらに高温での連続培養を継続中である。

High temperature, Cyanobacteria, Resequence analysis

講演番号：2C17p15
講演日時：3 月 18 日 17:50～ C 校舎 17 会場

# 難培養好熱性アーキアで発見されたユビキチンシステムの細胞内におけるタンパク質修飾機能解析

# Functional elucidation of *in vivo* protein modification of a eukaryote-type ubiquitin system from an uncultivated thermophilic archaeon

○萬代 由莉恵[1]、橘髙 瑞奈[1]、布浦 拓郎[2]、金井 保[1]、跡見 晴幸[1] ([1]京大院工、[2]海洋研究開発機構)
○ Yurie MANDAI[1], Mizuna KITTAKA[1], Takuro NUNOURA[2], Tamotsu KANAI[1], Haruyuki ATOMI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]JAMSTEC)

【背景・目的】ユビキチン (Ub) は真核生物に普遍的に存在し、標的タンパク質との選択的な Ub 化により細胞内の様々な生命活動に関与する。メタゲノム解析により解読された難培養性好熱性アーキア *Caldiarchaeum subterraneum* のゲノム上には、原核生物には例のない真核生物型 Ub 様遺伝子 (Ubl) が存在する。本 Ubl 遺伝子は、Ub 活性化酵素(E1)、Ub 結合酵素(E2)、Ub リガーゼ(E3)の各ホモログ遺伝子と共に原核生物特有のオペロン構造を構成している。アーキアで発見された Ubl 遺伝子群は、これまで真核生物で発生したとされてきた Ub システムの進化を正しく理解する上で、大変重要な存在といえる。私たちはこれまでに、本 Ubl システムの *in vitro* 再構成系の構築に成功し、本系が実際にタンパク質修飾活性を示すことを見出している。本研究では、本 Ubl システムが多数のタンパク質が共存する細胞内(*in vivo*)においても機能しうるかを検証することを目的とした。

【方法・結果】*C. subterraneum* は未だ培養法が確立されていないことから、実験には培養可能でありかつ形質転換法が確立している超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* を用いて、本 Ubl システム構成因子の細胞内発現を試みた。まずは Ubl オペロン全体 (Ubl-E2-E1-E3α-E3β)を *T. kodakarensis* 内での発現プラスミドに組込んだ（pRPEx01p）。また本菌の Ubl は Gly-Gly モチーフの後方にペプチド配列が存在する前駆体型(pUbl)であることから、この部分を遺伝子工学的に改変して成熟体 Ubl を発現するベクター（pRPEx01m）も作製した。これらのベクターを *T. kodakarensis* KPD1 株に導入し、0.1 mM $ZnCl_2$ を含む ASW-YT+Pyr 培地で 70°C, 24 h 培養した。得られた細胞抽出液を用いて Western blot 解析を行った結果、共に pUbl/Ubl, E1, E2, E3βの発現は確認されたものの、E3αの発現は確認されなかった。そこで E3αの開始コドンを確認したところ TTG であり、翻訳開始効率の低下が予想されたことから、これを ATG に改変したベクターpRPEx02p/pRPEx02m をそれぞれ作製した。その結果、E3αを含む全構成タンパク質の発現を確認した。次に、*T. kodakarensis* KPD1 株のゲノム内に、*in vitro* 再構成実験において本系の基質となることが判明している *Cs*-MCM の遺伝子を導入した（KPD1Mc 株）。本株に pRPEx02p/pRPEx02m を導入して同様に実験を行った結果、Western blot 解析により Ubl-MCM 複合体と思われるバンドが観察された。この結果より、本系は細胞内においてもタンパク質修飾活性を示すことが明らかとなった。

ubiquitin, metagenome, archaea

講演番号：2C17p16
講演日時：3 月 18 日 18:05～ C 校舎 17 会場

超好熱菌からの新規アセチルポリアミンの同定
Identification of a novel acetyl polyamine from *Thermococcus kodakarensis*
○林 基煥[1]、秀瀬 涼太[1]、小林 正樹[2]、新津 勝[2]、藤原 伸介[1] ([1]関西学院大学、[2]城西大学)
○ Kihwan Im[1], Ryota Hidese[1], Masaki Kobayasi[2], Masaru Niitsu[2], Shinsuke Fujiwara[1] ([1]Kwansei-Gakuin Univ., [2]Josai Univ.)

【背景と目的】ポリアミン(PA)は、一分子中にアミノ基を二つ以上含む塩基性物質であり、すべての生物で細胞増殖や分化などに重要な役割を担う。一方、その濃度調節は厳密に行われている(1)。大腸菌においてスペルミジンの蓄積は、栄養飢餓や低温ストレス条件下で細胞増殖阻害を引き起こす (2)。アセチル CoA 依存的にスペルミジンのアセチル化反応を触媒するスペルミジン/スペルミン-$N^1$-アセチル基転移酵素は PA 濃度の調節を担う。（超）好熱菌は、一般的な PA に加えて長鎖や分岐鎖ポリアミンは有する。我々はこれまでに超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* の分岐鎖ポリアミン $N^4$-ビス（アミノプロピル）スペルミジン（Bis-ApSPD）[3(3)(3)4]が高温（93℃）で著量蓄積し、本菌の生育に必須であることを明らかにしている (3)。一方、その代謝は全く不明である。本研究では Bis-ApSPD のアセチル体の存在を検証し、アセチル化酵素の探索を目的とした。
【実験結果と考察】 *T. kodakarensis* を 85℃で培養し、1%トリクロロ酢酸下での超音波処理により細胞を破砕し、ポリアミン粗抽出液を得た。得られた抽出液を陽イオン交換樹脂に供し、ポリアミン粗精製標品を得た。この標品に含まれる分岐鎖ポリアミンのアセチル体をガスクロマトグラフィーおよび高速液体クロマトグラフィー質量分析法で解析した。この結果、Bis-ApSPD の 1 つのアミノプロピル基にアセチル基が付加した $N^4$-ビス(アミノプロピル)-$N^1$-アセチルスペルミジン（Bis-ApAcSPD）を同定した。一方で、その他のアセチル化ポリアミンは見られなかった。次に、Bis-ApAcSPD の代謝動態を調べるために、*T. kodakarensis* を生育至適温度 85℃及び生育上限温度 93℃で培養し、対数期また定常期の細胞から得られたポリアミン粗抽出液を高速液体クロマトグラフィーで解析した。この結果、93℃では 85℃に比べ Bis-ApAcSPD の割合が多く、特に対数期で顕著であった。このことから Bis-ApAcSPD は高温のストレス環境下で多く合成されていると考察される。
(1) Pegg A, Am J Physiol Endocrinol Metab 294:E995–E1010 (2008); (2) Limsuwun et al. J. Bacteriol. 182:5373-80 (2000); (3) Okada et al., J. Bacteriol., 196:1866-1876 (2014)

Hyperthermophile, Polyamine, Archaea

講演番号：2C18a01
講演日時：3 月 18 日 09:20～ C 校舎 18 会場

# 枯草菌でのラムノースおよびその誘導体の取り込みに関わる遺伝子群の発現解析

# Expression analysis of the genes involved in the transport of rhamnose and its derivatives in *Bacillus subtilis*

○広岡 和丈、井川 優望、藤澤 聡美、藤田 泰太郎（福山大生命工・生物工）
○Kazutake HIROOKA, Yuumi IKAWA, Satomi FUJISAWA, Yasutaro FUJITA (Fukuyama Univ.)

根圏に生息する枯草菌は根から滲出する種々の有機化合物を栄養源としており、細胞壁ペクチン・根が分泌する粘液質・フラボノイド配糖体などに含有されるラムノースも炭素源として利用すると考えられた。我々は、枯草菌ゲノムからラムノース異化に関わる酵素群とその発現制御を担う転写因子（RhaR）をコードする *rhaEWRBMA* オペロンを見出し、各酵素の機能と転写制御機構を明らかにした（Hirooka, K., *et al*. 2016. J Bacteriol **198**:830-845.）。しかしながら、このオペロンには輸送体がコードされておらず、枯草菌でのラムノース取り込み機構は不明のままである。そこで、他の細菌でのラムノース輸送体などの情報をもとに、枯草菌でのラムノース取り込みに関わるタンパク質候補を選び、その遺伝子発現がラムノースによって誘導されるかをレポーター実験で調べ、また遺伝子破壊によってラムノース資化能が消失するかを培養実験で調べた。

大腸菌のラムノース輸送体（RhaT）と相同性を示す、枯草菌の GlcU に関して、プロモーター活性はラムノースでは誘導されず、代わりにペクチン添加によって誘導され、その誘導効果はグルコースをさらに添加すると抑制されることがわかった。また、この遺伝子破壊株はラムノースを唯一の炭素源とした培地で生育可能であることがわかった。

枯草菌においてペクチンの糖鎖分解に働く遺伝子群（*rhiLFGN-rhgR-yesTUVWXYZ*）には、その産物が ABC 輸送体の構成成分であると推定されるもの（RhiLFG）も含まれており、これらがラムノース取り込みも担う可能性が考えられた。*rhiL* および *yesW* の上流域にプロモーター配列を見出したので、それぞれについて種々の糖の誘導効果を調べた結果、いずれも *glcU* プロモーターの場合と同様にラムノースでは誘導されず、ペクチンによって特異的に誘導され、その効果がグルコース添加で抑制されることがわかった。また、*rhiL*、*rhiF*、および *rhiG* の各遺伝子破壊株がラムノースを唯一の炭素源として生育可能であることがわかった。この遺伝子群の内と近傍上流には転写因子をコードする遺伝子が１つずつ（*yesN* と *rhgR*）存在しており、これらの転写因子が *rhiL* および *yesW* プロモーター活性制御に寄与するかを確かめるために、当該転写因子遺伝子を破壊した条件でのレポーター解析を現在行っている。

放線菌においてラムノース取り込みに関わると推定される ABC 輸送体（RhaGHJF）と相同性を示す、枯草菌のタンパク質群をコードする *rbsRKDACB* オペロンについて、種々の糖の誘導効果を調べた結果、グルコースで抑制され、ラムノースを含む複数の糖で誘導されることがわかった。

rhamnose, sugar transport, *Bacillus subtilis*

発表責任者：広岡 和丈（hirooka@bt.fubt.fukuyama-u.ac.jp）

講演番号：2C18a02
講演日時：3 月 18 日 09:35～ C 校舎 18 会場

コリネ型細菌におけるメチオニン合成酵素 MetE の発現制御機構の解析
Regulatory mechanism of gene expression of *metE* encoding methionine synthase in *Corynebacterium glutamicum*
○高橋 慧、高田 明香、岩井 伯隆、和地 正明（東工大・生命理工学院）
○Satoshi Takahashi, Haruka Takada, Noritaka Iwai, Masaaki Wachi (Dept. Life Sci. Technol., Tokyo Tech.)

［背景と目的］
*Corynebacterium glutamicum* は 1956 年にグルタミン酸生産菌として発見され、以来、生産量の増大や生産機構の解明を目指して精力的に研究されてきた。本菌にビオチン制限やペニシリン処理といった表層構造を変化させる処理を施すと、生育が止まり、著量のグルタミン酸が生産される。本研究では *C. glutamicum* がなぜ特定の条件でグルタミン酸を生産するのか、その生理的意義の解明を目指している。これまでの研究により、グルタミン酸排出チャネルタンパク質 NCgl1221 が見出された。NCgl1221 欠損株は、グルタミン酸生産誘導処理を施してもグルタミン酸をほとんど排出せず、細胞内にグルタミン酸を蓄積する。この時のタンパク質の発現パターンを解析すると、分子量 80 kDa のメチオニン合成酵素 MetE が過剰発現していることが見出された。本研究では、MetE の過剰発現が起こるメカニズムと、その役割の解明を目的とした。
［方法と結果］
*metE* 欠損株を構築しグルタミン酸生産実験を行ったところ、生産量が大幅に低下した。このことから、グルタミン酸生産には継続的なメチオニンの供給が必要であると考えられた。*metE* プロモーターに *lacZ* 遺伝子を融合したプラスミドを NCgl1221 欠損株に導入して発現を調べたところ、生産誘導処理により LacZ の発現が増大した。このことから、MetE の過剰発現は転写レベルで引き起こされていると考えられた。*metE* 上流領域の欠失や変異の導入によって、LacZ の発現が大幅に抑制されたことから、MetE の過剰発現は未知の転写因子によって引き起こされていることが示唆された。
チオール含有抗酸化剤である *N*-アセチルシステインや 2-メルカプトエタノールの添加により MetE の過剰発現が抑制されたことから、NCgl1221 欠損株の細胞内では酸化ストレスが生じていることが示唆された。酸性条件においてコリネの細胞内では過酸化水素が生じるとの報告もあり、グルタミン酸の細胞内蓄積によって酸化ストレスが生じていると考えられる。
今後、*metE* 遺伝子の転写活性化に関与する転写因子の探索・同定を進める予定である。

*Corynebacterium glutamicum*, gene expression, methionine synthase

発表責任者：和地　正明（mwachi@bio.titech.ac.jp）

講演番号：2C18a03
講演日時：3 月 18 日 09:50～ C 校舎 18 会場

*Shewanella oneidensis* MR-1 株における CRP 依存的 D-乳酸代謝制御機構
CRP regulates D-lactate metabolism in *Shewanella oneidensis* MR-1
○笠井 拓哉、高妻 篤史、渡邉 一哉（東薬大生命）
○Takuya KASAI, Atsushi KOUZUMA, Kazuya WATANABE (Tokyo Univ. Parm. Life Sci.)

【背景・目的】*Shewanella oneidensis* MR-1 株は多様な呼吸能を持つ通性嫌気性細菌であり、酸素やフマル酸等の可溶性物質以外にも、細胞外に存在する金属化合物を電子受容体として呼吸を行うことが可能である。MR-1 株は、嫌気環境における異化的金属還元細菌や微生物燃料電池における発電菌のモデルとして広く研究されており、これまでの研究により嫌気呼吸系遺伝子の発現制御には cyclic AMP receptor protein (CRP) が関与していることが明らかになっている。一方、電子の供給源である炭素の異化代謝系の制御機構は未解明な点が多い。MR-1 株は炭素源として乳酸を好み、NADH 非依存性の乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) によって乳酸をピルビン酸へと酸化する。この反応に伴って放出された電子は内膜キノンと嫌気呼吸系を介して最終電子受容体（金属化合物や電極等）へと伝達される。本研究では、これら異化代謝系が協調的に制御される可能性を考え、CRP が LDH 遺伝子の発現に関与する可能性を調査した。
【結果】*crp* 遺伝子の破壊株 (Δ*crp*) を作製し、乳酸（D/L-体混合物）を唯一の炭素源とした最少培地 (LMM) を用いて好気培養を行った。その結果、Δ*crp* の最終菌体量は野生株 (WT) の半分ほどであった。培養後の培地中の乳酸濃度を測定した結果、Δ*crp* は D-乳酸をほとんど代謝していないことが明らかとなった。次に、定量的 RT-PCR によって D-LDH をコードする *dld-II* 遺伝子の発現量を WT とΔ*crp* の間で比較した。その結果、Δ*crp* では、*dld-II* の発現量が著しく減少していることが明らかとなった。また、Δ*crp* で *dld-II* を恒常的に発現させたところ、D-乳酸の資化能が回復した。これらの解析から、Δ*crp* における D-乳酸の代謝障害の原因は、*dld-II* の発現量の低下であることが明らかとなった。MR-1 ゲノムにおいて、D/L-乳酸代謝系遺伝子は同一方向に並んでクラスターを形成しており、*dld-II* は乳酸パーミアーゼをコードすると予想される *lldP* 遺伝子の下流に位置する。これらの遺伝子の転写単位を RT-PCR によって解析した結果、*lldP* と *dld-II* はオペロンとして転写されることが示された。このオペロンの転写活性化に関与するプロモーター領域を同定するため、*lacZ* 遺伝子を用いたレポーターアッセイを行った結果、転写開始点から 118 bp 上流までの領域が転写活性化に関与することが明らかとなった。転写活性化領域内には CRP 結合モチーフと類似した配列が見出されたため、ゲルシフトアッセイにより CRP との相互作用を解析した結果、本領域に CRP が結合することが示された。以上の結果から CRP が *lldP–dld-II* オペロンの転写を直接制御することが明らかとなり、乳酸代謝系と嫌気呼吸系が CRP によって協調的に制御に関与される可能性が示唆された。

cyclic AMP receptor protein, lactate metabolism, Shewanella oneidensis MR-1

発表責任者：笠井 拓哉（s096051@toyaku.ac.jp）

講演番号：2C18a04
講演日時：3 月 18 日 10:05～ C 校舎 18 会場

*Shewanella oneidensis* MR-1 株の MetR による嫌気呼吸制御機構の解明
MetR regulates anaerobic respiration in *Shewanella oneidensis* MR-1
○茂木 久恵、高妻 篤史、渡邉 一哉（東薬大生命）
○Hisae MOGI, Atsushi KOUZUMA, Kazuya WATANABE (Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.)

【背景・目的】
*Shewanella oneidenis* MR-1 株は多様な呼吸能を持ち、ゲノム情報が既知であること、遺伝子操作が容易であるなどから、環境細菌のモデルとして広く研究されている。また細胞外電子伝達系を持つため、細胞内の代謝で生じた電子を細胞外の電子受容体（固体金属や電極）へと伝達することが可能であり、微生物燃料電池内で発電菌として機能することも知られている。しかし、MR-1 株において細胞外電子伝達系等の嫌気呼吸系がどのように制御されているのかについては不明な点が多い。これまでに、CRP (cAMP receptor protein) が本株の嫌気呼吸系遺伝子の転写活性化を行うグローバルレギュレーターとして働くことが報告されている。一方、我々は最近、MR-1 株の電流生産がメチオニンの添加によって活性化されること、またメチオニン代謝を制御する転写因子 MetR の恒常的発現株（*metR*-CE）は電流を殆ど生産しないことを見出した。これらの結果は、メチオニンまたはその細胞内代謝産物が MR-1 株の細胞外電子伝達系を制御するシグナル分子として働き、MetR がその制御を担う転写因子として機能することを示唆している。本研究では、MR-1 株における MetR による発現制御のメカニズムを解明するため、MetR が標的とする遺伝子とプロモーター配列の同定を行った。
【方法・結果】
MetR が MR-1 株の遺伝子発現に与える影響を調べるため、野生株と *metR*-CE 株を嫌気条件下で培養し、両株の遺伝子発現を DNA マイクロアレイにより比較した。その結果、*metR*-CE 株では細胞外電子伝達系 (*omcA*、*mtrCAB*、*cymA*) や他の嫌気呼吸系遺伝子 (フマル酸、硝酸、DMSO 還元遺伝子等) の発現量が著しく低下しており、MetR が嫌気呼吸系の発現抑制に広く関与することが示された。また、MetR が嫌気呼吸系遺伝子を直接的に制御するかを調べるため、細胞外電子伝達系遺伝子 (*omcA*) 上流域への MetR の結合をゲルシフトアッセイにより検証した。その結果、MetR は *omcA* 上流域（CRP 結合配列の下流）に結合することが明らかとなり、この結合により CPR による嫌気呼吸系遺伝子の転写活性化が妨げられる可能性が示唆された。MetR の結合モチーフ配列は他の多くの嫌気呼吸系遺伝子の CRP 結合配列の下流にも保存されていることから、MetR は CRP と競合的に働くことによって嫌気呼吸系を抑制する負のグローバルレギュレーターとして広く機能すると考えられる。本研究成果は、アミノ酸代謝とエネルギー代謝の連携を示唆するものであり、環境細菌の生存戦略の一つとして注目される。現在 MetR の標的配列についてさらに詳細な解析を行っている。

*Shewanella oneidensis*, anaerobic respiration, transcriptome

講演番号：2C18a05
講演日時：3 月 18 日 10:20～ C 校舎 18 会場

*Acidithiobacillus ferrooxidans* における窒素固定制御転写因子 NifA の機能解析
Functional analysis of transcription factor NifA involved in nitrogen fixation in *Acidithiobacillus ferrooxidans*

○山田 祥平、高妻 篤史、渡邉 一哉（東薬大生命）
○Shohei YAMADA, Atsushi KOUZUMA, Kazuya WATANABE (Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.)

【背景・目的】近年の人口増加に伴う食糧不足を補うには、化学肥料となるアンモニアの増産が不可欠である。現在アンモニアはハーバー・ボッシュ法を基にした化学工業により製造されているが、これには莫大な量の化石燃料が使用されている。一方窒素固定微生物を用いれば、温和な条件下でのアンモニア合成が可能となり、大幅に省エネなアンモニア合成が可能になるかもしれない。*Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC23270 株は独立栄養的に増殖可能な鉄酸化細菌であり、ニトロゲナーゼを持つために大気中の窒素を固定して生育することができる。また、ATCC23270 株は電気培養（電極から供給される電子をエネルギー源とする培養法）により良好に増殖するため、本株を用いれば、空気と電気を用いた安価なアンモニア生産バイオプロセスが構築できると期待される。しかし、一般に微生物の窒素固定系は窒素源（$NH_4^+$等）の存在によって厳密に抑制され、必要以上のアンモニアが合成されないことが知られている。一方、ゲノム解析の結果から ATCC23270 株にも窒素固定制御系（NifA 転写因子等）の存在が予想されたが、その機能については研究されていない。そこで本研究では、ATCC23270 株の窒素固定制御系の解明を目的とし、本株の窒素固定制御系に関与すると予想された NifA 転写因子の機能について調査した。
【方法・結果】*A. ferrooxidans* ATCC23270 株において、窒素源（$NH_4^+$）の有無が遺伝子発現に与える影響を DNA マイクロアレイにより解析した結果、$NH_4^+$非添加時にニトロゲナーゼ遺伝子（*nifHDK*）の発現量が上昇することが示され、本株の窒素固定系は $NH_4^+$の有無に依存して制御されることが明らかになった。しかし、*nifH* の近傍に位置する *nifA* の発現量は $NH_4^+$の有無に関わらず変動しなかった。この結果から、NifA が窒素源の有無を感知するセンサーとして機能する可能性が考えられた。NifA の窒素固定系の発現への関与を調べるため、*nifA* の過剰発現株を作製した結果、$NH_4^+$非添加時にニトロゲナーゼ活性が増加した。また *nifA* 過剰発現株の遺伝子発現を DNA マイクロアレイにより解析した結果、$NH_4^+$非添加時にニトロゲナーゼ遺伝子を含む多くの窒素固定系遺伝子の発現が野生株よりも増加することが示された。以上の結果から、NifA が ATCC23270 株の窒素固定系遺伝子の転写制御において中心的な役割を果たすと考えられる。また *nifA* 過剰発現株は $NH_4^+$非添加時に野生株よりも高い増殖速度を示し、窒素源が不足する環境下でニトロゲナーゼ活性が生育を律速する要因となることが示された。これらの知見は、*A. ferrooxidans* をアンモニア生産やバイオリーチングに応用する上で重要と考えられる。

*Acidithiobacillus ferrooxidans*, nitrogen fixation, transcriptome

発表責任者：山田祥平（s126210@toyaku.ac.jp）

講演番号：2C18a06
講演日時：3 月 18 日 10:45～ C 校舎 18 会場

Lrp 様転写因子が酢酸菌の基幹代謝に及ぼす影響
Effects of a leucine responsive regulator on essential metabolisms in acetic acid bacteria
○石井 友理[1]、赤坂 直紀[2]、佐古田 久雄[2]、秀瀬 涼太[1]、阿部 達明[3]、兼崎 友[4]、石川 森夫[3]、貝沼（岡本） 章子[3]、藤原 伸介[1] ([1]関西学院大理工、[2]マルカン酢(株)、[3]東京農大・応生科醸造、[4]東京農大・ゲノムセンター)
○Yuri Ishii[1], Naoki Akasaka[2], Hisao Sakoda[2], Ryota Hidese[1], Tatsuaki Abe[3], Yu Kanesaki[4], Morio Ishikawa[3], Akiko Okamoto-Kainuma[3], Shinsuke Fujiwara[1] ([1]Kwansei Gakuin Univ., [2]Marukan Vinegar Co. Ltd., [3]Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. Agric., [4]Genome Research Center, Tokyo Univ. Agric.)

【背景と目的】 酢酸菌は、古くから慣習的に食酢製造に用いられてきた微生物である。食酢製造工程において、酢酸菌は細胞膜結合型脱水素酵素群によりエタノールを酸化し、食酢主成分である酢酸を産生する。この酸化反応はユビキノール・オキシダーゼと連動した呼吸鎖電子伝達系であり、エネルギー生産の大部分をエタノール酸化に依存する酢酸菌にとって、極めて重要な基幹代謝である[1)]。

これまでに、酢酸菌 *Komagataeibacter europaeus* 由来 Lrp(*Ke*Lrp, 大腸菌 Leucine responsive regulatory protein のオルソログ)が、アミノ酸代謝の中でも分岐鎖アミノ酸[2)]およびメチオニン代謝関連遺伝子群の発現を制御し、細胞内における同アミノ酸群やポリアミンの恒常性維持に関与することが示唆されている。しかしながら、*Ke*Lrp 完全欠損株の最少培地での生育遅延は分岐鎖アミノ酸、メチオニンおよびスペルミジン等を添加した培地でも完全には解消されなかった。このことから、*Ke*Lrp は上記のアミノ酸代謝に加え、中枢代謝や呼吸等酢酸菌における基幹代謝の調節にも関与することが考えられた。これらを踏まえ、*Ke*Lrp 標的遺伝子群を網羅的に同定するため、*K. europaeus* 野生株および *Kelrp* 完全欠損株の mRNA を供試した、次世代シーケンサー(HiSeq 2500)を用いた mRNA-seq 法を実施した。

【結果と考察】遺伝子コード領域を予測したゲノム配列に対し、本解析により得られたショートリードをマッピングし、完全欠損株において転写量が増減している遺伝子の同定、およびこれら遺伝子が関与する代謝系を特定した。完全欠損株では、グルコースの取り込み系や、解糖系・ペントースリン酸経路・Entner-Doudoroff 経路を含む中枢代謝系に関わる遺伝子群の転写量が増加していた。一方、呼吸鎖関連遺伝子群の転写変動に着目したところ、膜結合型脱水素酵素群のうち、アルコール脱水素酵素(ADH)およびグルコース脱水素酵素(GDH)の補酵素であるピロロキノリンキノン(PQQ)生合成遺伝子やアセトアルデヒド脱水素酵素(ALDH)をコードする遺伝子の転写量が完全欠損株では減少していた。このことから、*Ke*Lrp の欠損は膜結合型脱水素酵素群の活性に影響を与える可能性が考えられた。そこで、野生株および完全欠損株から取得した膜画分を用いエタノール・アセトアルデヒド・グルコースのそれぞれ対する脱水素酵素活性[3)]を検証した。その結果、エタノールおよびアセトアルデヒドを基質とした条件において、完全欠損株では野生株と比較して活性の低下が認められた。これらのことから、*Ke*Lrp はアミノ酸代謝のみならず、酢酸菌の呼吸の制御にも関与しており、本菌の生存にとって必須の転写因子であることが考えられた。

1) Yakushi et al. 2010. Appl. Microbiol. Biotechnol. 86:1257-65. 2) Akasaka et al. 2014. J. Biosci. Bioeng. 118:607-15. 3) Ameyama and Adachi. 1982. Methods in Enzymology. 89:450-7.

acetic acid bacteria, leucine responsive regulatory protein, respiratory chain

講演番号：2C18a07
講演日時：3 月 18 日 11:00～ C 校舎 18 会場

RNA-seq 法による酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* NBRC 3283 株の RpoE レギュロンの解析
Analysis on RpoE regulon in *Acetobacter pasteurianus* NBRC 3283 using RNA-seq method

○佐藤 契太[1]、石川 森夫[1]、鈴木 敏弘[1]、原田 佳子[1]、勝間田 憲子[1]、兼崎 友[2]、吉川 博文[2,3]、貝沼(岡本) 章子[1] ([1]東京農大・応生科・醸造、[2]東京農大・ゲノムセンター、[3]東京農大・応生科・バイオ)

○Keita Sato[1], Morio Ishikawa[1], Toshihiro Suzuki[1], Keiko Harada[1], Noriko Katsumata[1], Yu Kanesaki[2], Hirofumi Yoshikawa[2,3], Akiko Okamoto-Kainuma[1] ([1]Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. Agric., [2]Genome Research Center, Tokyo Univ. Agric., [3]Dept. Biosci., Tokyo Univ. Agric.)

【目的】酢酸菌のエタノール存在下における生育時の菌体外環境は、酢酸発酵による酢酸の蓄積や自身の生成した酢酸の自己消費(過酸化)、また過酸化後の基質の枯渇などで大きく変化し、菌体はそれらに応答する機構を有することが推測される。演者らは、酢酸菌の環境応答メカニズムの解明の一環として、多岐にわたるストレスに応答するシグマ因子として知られている RpoE と酢酸発酵生理との関連について検討を行い、本因子が熱・酢酸・定常期ストレス応答に関与すること、本菌が保持しない定常期シグマ因子、RpoS の代替として機能すること、ヒートショックシグマ因子 *rpoH* の発現を正に制御すること、さらに RNA-seq 法によるトランスクリプトーム解析により多くの遺伝子が本因子によって調節を受ける可能性を明らかにしている [1),2)]。本研究では、RNA-seq 法による解析を更に詳細な形で進めることにより、本菌 RpoE レギュロンの全容の解明を試みた。

【方法及び結果】*Acetobacter pasteurianus* NBRC 3283 株，及び同 *rpoE* 破壊株を供試し、エタノールを炭素源として培養を行った。培養各フェーズにおいて、菌体内に発現している遺伝子を RNA-seq 法で解析した結果、*rpoE* 遺伝子の破壊によって発現量が 1.5 倍以上減少または増加した遺伝子を多数検出し、本菌ゲノム上にコードされる約 3000 遺伝子のうちおよそ 2 割の遺伝子が本因子に制御される可能性が示唆された。また、発現変動が見られた遺伝子数は酢酸蓄積期以降顕著に増加し、本因子は主に酢酸蓄積後の生理と関連する可能性が示唆された。これら RpoE 支配下遺伝子について機能別分類を行った結果、本因子に正に制御された遺伝子には他の細菌において RpoE または RpoS 支配下とされる遺伝子群が多く含まれていた。一方、本因子に負に制御された遺伝子には RpoH 支配下とされる遺伝子群が多く含まれていた。正・負いずれの場合も、変動遺伝子の約 8 割(正の制御)及び 7 割(負の制御)の上流域に RpoE の推定認識配列が確認され、これらの遺伝子群が RpoE により直接的に支配されていることが強く推測された。以上のことより、本菌の RpoE は正・負いずれの制御能も有する特徴的なレギュロンを構成し、酢酸発酵により生じる環境変化に応答するグローバルな発現制御因子として機能する可能性が強く示唆された。

1) 原田ら：日本農芸化学会 2015 年度大会講演要旨集，2A21p09（2015）
2) 佐藤ら：日本農芸化学会 2016 年度大会講演要旨集，3F126（2016）

*Acetobacter pasteurianus*, acetic acid fermentation, RpoE

発表責任者：貝沼(岡本) 章子（okamoto@nodai.ac.jp）

講演番号：2C18a08
講演日時：3 月 18 日 11:15～ C 校舎 18 会場

RNA-seq 法による酢酸菌 2 属のグルコース利用時における代謝戦略の比較解析
Comparative study on metabolic strategy of two genera of acetic acid bacteria in the presence of glucose using RNA-seq

○阿部 達明[1]、石川 森夫[1]、鈴木 敏弘[1]、兼崎 友[2]、松原 拓哉[1]、吉川 博文[2,3]、貝沼(岡本) 章子[1] ([1]東京農大応生科・醸造、[2]東京農大・ゲノムセンター、[3]東京農大応生科・バイオ)
○ Tatsuaki Abe[1], Morio Ishikawa[1], Toshihiro Suzuki[1], Yu Kanesaki[2], Takuya Matsubara[1], Hirofumi Yoshikawa[2,3], Akiko Okamoto-Kainuma[1] ([1]Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. Agric, [2]Genome Research Center, Tokyo Univ. Agric, [3]Dept. Biosci., Tokyo Univ. Agric)

**【目的】**食酢醸造に用いられる酢酸菌は主に二属であるが、このうち *Acetobacter* 属酢酸菌は伝統的製法である表面発酵法に、*Komagataeibacter* 属酢酸菌は近代的製法である深部発酵法に主に用いられる。いずれも、細胞膜上でのエタノールやグルコースの酸化発酵（酢酸発酵及びグルコン酸発酵）及び細胞内での基幹代謝経路を介した通常の好気代謝という、二種類のエネルギー生成系を有していることが知られている。演者らは以前、両属酢酸菌のエタノール利用時における菌体生理について RNA-seq 法を用いて解析し、代謝系遺伝子の発現変動を検討することにより、酢酸発酵時とそれに続く生成酢酸消費時の間での菌体内代謝経路の駆動状況の違いについて明らかにした。[1)] 今回は、グルコース利用時における代謝挙動について同様の解析を行ったので報告する。
**【方法および結果】**使用菌株としては、*Acetobacter pasteurianus* NBRC 3283、*Acetobacter aceti* NRIC 0242[T]、*Komagataeibacter. medellinensis* NBRC 3288 を供試した。グルコース存在下における生育挙動を比較した結果、*Acetobacter* 属二種はグルコン酸生成を伴う一段階の増殖挙動を示した一方、*K. medellinensis* はグルコン酸生成及びグルコン酸消費を伴う二段階の増殖挙動を示した。それぞれの菌について、各生育時期における RNA-seq 解析を行い、代謝関連遺伝子の発現挙動を比較した結果、*Acetobacter* 属二種はいずれもグルコン酸発酵時に活発な基幹代謝系の活動を示した一方、*K. medellinensis* ではそのような挙動は観察されなかった。しかし、*K.medellinensis* では、本菌のみで観察されたグルコン酸消費時に、グルコン酸発酵時と比べ活発な基幹代謝系の駆動が起こることが確認された。これらのことより、グルコースを炭素源とした場合、*Acetobacter* 属酢酸菌においては酸化発酵と細胞内代謝がある程度並行して進行するのに対し、*Komagataeibacter* 属酢酸菌においてはエタノールの場合と同様に「酸化発酵ー生成物の細胞内代謝」という、段階的な代謝系の使い分けが起こっていることが強く示唆された。

1）松原ら：日本農芸化学会 2015 年度大会講演要旨集，2A21p07（2015）

*Acetobacter pasteurianus*, RNA-seq, Glucose metabolism

発表責任者：貝沼(岡本）章子（okamoto@nodai.ac.jp）

講演番号：2C18a09
講演日時：3 月 18 日 11:30～ C 校舎 18 会場

超好熱・好酸性古細菌 *Sulfolobus acidocaldarius* におけるアルギニン生合成酵素遺伝子の転写調節機構に関する研究

Studies on transcriptional regulatory mechanism of arginine biosynthesis in hyperthermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*

○中西 史佳、富田 武郎、葛山 智久、西山 真（東大・生物工学セ）
○Fumika NAKANISHI, Takeo TOMITA, Tomohisa KUZUYAMA, Makoto NISHIYAMA (BRC, UTokyo)

一般的な細菌や植物とは異なり、超好熱・好酸性古細菌 *Sulfolobus acidocaldarius* は、α-アミノアジピン酸 (AAA) を中間体とする新規な生合成経路 (AAA 経路) でリジンを生合成することが当研究室によって明らかにされた。AAA 経路の後半部分を構成している遺伝子 (*lysXWZYJK*) がゲノム上でクラスターを形成しているが、これらの遺伝子がコードする LysXWZYJK は同時にアルギニン生合成におけるグルタミン酸からオルニチンへの変換をも触媒する bi-functional な酵素であることも明らかになっている。*lysXWZYJK* は同クラスター内に存在する転写調節因子 LysM を介して過剰なリジンによる転写制御を受けることが別のグループにより示されている一方、LysWZYJK はアルギニン生合成も担うにも関わらず、それをコードする遺伝子のアルギニンによる制御は明らかとなっていない。そこで、アルギニン生合成に関して異なった制御機構が存在する可能性が予想される。本研究では *S. acidocaldarius* におけるアルギニン生合成経路の転写調節機構の解明を目的とした。

アルギニン生合成に関わる酵素遺伝子のうち、初発酵素 ArgX と、オルニチンからアルギニンへの変化を触媒する ArgG と ArgH をコードする遺伝子がクラスターを形成している。これらの遺伝子の転写量は、アルギニン存在下で抑制、リジン存在下で促進されることが qPCR 解析の結果から示唆された。このことから、リジンやアルギニンを感知しながら同クラスターの上流に作用し、転写制御を行う因子が存在すると考え、ゲルシフトアッセイなどの方法でその特定を目指した。*S. acidocaldarius* において、リジン生合成の転写調節因子 LysM は、アミノ酸生合成を含む様々な機能に関わる転写調節因子ファミリー、Lrp (Leucine-responsive Regulatory Protein) family に属している。これらは、DNA 結合ドメインと、アミノ酸の結合および多量体形成時の会合を担う RAM ドメインから構成されることが多い。同様に、アルギニン生合成遺伝子クラスターの制御にも Lrp ホモログが転写調節因子となって働く可能性を考え、*lysM* の配列を query とした相同性検索・二次構造予測により 8 つの候補遺伝子を見出した。全ての精製タンパク質を用いてアルギニン生合成酵素遺伝子クラスター上流配列に対するゲルシフトアッセイを行ったところ、Saci_2040 と Saci_2136 がアルギニン生合成遺伝子クラスター上流に結合することを見出した。特に、Saci_2040 は、アルギニンあるいはリジン存在下でその結合親和性が上昇することが確認された。このことから、*saci_2040* と *saci_2136* がアルギニン生合成の転写制御に関わっている可能性が示唆された。これらの遺伝子の生体内での機能を調べるため、遺伝子破壊株・高発現株を作製し、その転写変動解析・生育測定を行っているところである。また、*S. acidocaldarius* はこれらの候補とは別に RAM ドメインのみで存在する stand-alone RAM ドメインタンパク質を 2 種類持っていることがわかった。これらが Lrp ホモログと協同してアルギニン生合成の転写調節に関わっている可能性を考え、現在解析中である。

arginine biosynthesis, transcriptional regulation, archaea

発表責任者：西山真（umanis@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2C18a10
講演日時：3 月 18 日 11:45～ C 校舎 18 会場

# 腸内細菌の中心代謝を制御する mRNA クロストーク

# Crosstalk between bacterial mRNAs controls central metabolic pathways

○宮腰 昌利 (秋田県大生資科)
○Masatoshi MIYAKOSHI (Akita Pref. Univ.)

RNA シャペロン Hfq は 3’末端の poly U 配列に結合して、RNA 間の塩基対形成とそれに伴う転写後レベルの遺伝子発現を促進する。従って内因性転写終結する原核生物 mRNA も Hfq と結合して転写後レベルの制御因子として機能する可能性がある（Miyakoshi et al., 2015 Curr. Opin. Micro.）。TCA サイクルの 3 反応の酵素群をコードする *sdhCDAB-sucABCD* mRNA の 3’非翻訳領域（3’UTR）は大腸菌やサルモネラで高く保存され、Hfq と結合することが知られている。CopraRNA プログラムを用いて *sucD* 3’UTR と相補的な塩基配列を翻訳開始部位に持つ mRNA を腸内細菌科ゲノムから探索したところ、酢酸キナーゼをコードする *ackA* が第一の標的 mRNA として見出された。*sucD* 3’UTR は *ackA* の翻訳開始部位と塩基対を形成して翻訳を抑制することが相補的塩基置換によって示された。また、TCA サイクル酵素群が多く発現する、酢酸を炭素源とした好気培養において AckA は強く抑制され、*sucD* 3’UTR の変異によって抑制が解除された。アセチル CoA 合成酵素 *acs* 欠損株では *sucD* 3’UTR の変異によって酢酸を炭素源とする時に生育が顕著に阻害された。以上から、生理学的な条件で *sucD* と *ackA* の塩基対形成が中心代謝を転写後レベルで制御することが明らかになった。

post-transcriptional regulation, acetate kinase, TCA cycle

発表責任者：宮腰昌利（mmiyakoshi@akita-pu.ac.jp）

講演番号：2C18p01
講演日時：3 月 18 日 14:00～ C 校舎 18 会場

麹菌 *A. oryzae* における HET ドメインを有するタンパク質の機能解析
Functional analysis of HET domain proteins in *Aspergillus oryzae*
○森 法子[1]、北村 遼[1]、片山 琢也[1]、岩下 和裕[2]、丸山 潤一[1] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]酒総研)
○Noriko Mori[1], Ryou Kitamura[1], Takuya Katayama[1], Kazuhiro Iwashita[2], Jun-ichi Maruyama[1]
([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]NRIB)

【背景】

麹菌 *Aspergillus oryzae* は食品醸造やタンパク質生産に用いられており、それぞれの用途に応じて様々な株が利用されている。糸状菌では特定の株間で細胞融合を行った際に、異核共存体が死に至るまたは十分な生育ができない不和合性という性質が知られている。我々は最近、*A. oryzae* 実用株において不和合性となる株の組み合わせが存在することを発見した [1)]。他の糸状菌 *Neurospora crassa* や *Podospora anserina* では、株間における遺伝子の配列多型が不和合性の原因となることが知られている。なかでも、HET ドメイン(Pfam06985)と呼ばれる約 150 アミノ酸の領域をもつタンパク質（以下、HET ドメインタンパク質）が、株間の不和合性の決定に関与する例が複数報告されている。一般に各々の糸状菌は、HET ドメインタンパク質をコードする遺伝子を数十個有することが知られているが、機能解析はほとんど進んでいない。本研究では、*A. oryzae* において HET ドメインタンパク質の機能解析を行った。

【結果】

*A. oryzae* のゲノムデータベースの情報を検索した結果、HET ドメインタンパク質をコードする遺伝子が 40 個存在することがわかった。不和合性の組み合わせである野生株 RIB40 と日本酒製造用株 RIB128 について、各遺伝子の塩基配列について比較した。株間での配列多型の多いものから 6 つの遺伝子を選択し、RIB128 株由来の遺伝子を RIB40 株において *amyB* プロモーター制御下で発現させたところ、生育を著しく低下させる遺伝子 AO090001000078 (*Ao078*)を見いだした。一方、RIB40 株の内在の *Ao078* $^{RIB40}$ 遺伝子を過剰発現させた場合にはこのような生育の著しい低下は見られず、RIB128 株由来の *Ao078* $^{RIB128}$ 遺伝子に特異的な現象であることがわかった。また、*Ao078* $^{RIB40}$ 遺伝子と *Ao078* $^{RIB128}$ 遺伝子の共存により生育が阻害されるのかを検討するため、*Ao078* $^{RIB128}$ 遺伝子を発現する RIB40 株において内在の *Ao078* $^{RIB40}$ 遺伝子を破壊したが、生育の回復は認められなかった。このことから、RIB40 株における *Ao078* $^{RIB128}$ 遺伝子の発現による生育阻害が、内在する *Ao078*$^{RIB40}$ 遺伝子との共存によるものでないことが示された。現在、*Ao078* 遺伝子の RIB40 株と RIB128 株の不和合性への寄与について検討を行っている。

1) 岡部ら、2016 年度日本農芸化学会大会講演要旨 2F053

*Aspergillus oryzae*, incompatibility, cell fusion

発表責任者：丸山潤一（amarujun@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2C18p02
講演日時：3 月 18 日 14:15～ C 校舎 18 会場

Analysis of a conserved transcriptional factor Ste12 in the regulation of cell fusion of *Aspergillus oryzae*.

○Taoning MO[1], Takuya KATAYAMA[1], Ozgur BAYRAM[2], Daigo TAKEMOTO[3], Gerhard H. BRAUS[4], Katsuhiko KITAMOTO[1], Jun-ichi MARUYAMA[1] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]Dept. of Biol., Maynooth Univ., [3]Grad. School Bioagr. Sci., Nagoya Univ., [4]Dept. of Mol. Microbiol., Georg-August-University Gottingen)

[Background]

Cell fusion plays a crucial role in the development process of many eukaryotic organisms. In yeast, cell fusion occurs during mating, which is regulated by mitogen activated protein kinase (MAPK) cascade consisting of Ste11, Ste7, and Fus3, and the downstream transcription factor Ste12. In filamentous fungi, cell fusion occurs during vegetative growth and comprises of two different fusion types: conidial anastomosis between germinating conidia and hyphal fusion between growing hyphae. Due to different fusion periods, the regulatory mechanism of cell fusion in filamentous fungi is possibly distinct from yeast. In filamentous fungi, three orthologous components of the MAPK cascade and Ste12 are conserved. Fus3 orthologs have been identified to be essential for the cell fusion. The contribution of Ste12 orthologs in cell fusion is diverse in different fungal species, and its regulatory mechanism is poorly studied. Previously, we demonstrated the interaction between Fus3 ortholog AoFus3, Ste12 ortholog AoSte12 and FipC (Fus3-interacting protein C) in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*[1)], suggesting the possibility that AoSte12 is regulated by AoFus3 and FipC. Therefore, we aim to clarify the function of AoSte12 in the cell fusion of *A. oryzae*.

[Results]

By performing the complementation method of different auxotrophies[2)], our previous study showed that deletion of the *Aoste12* gene decreases the fusion efficiency to 1/3 compared to the wild-type strain[1)], indicating that AoSte12 are involved in cell fusion of *A. oryzae*. To further clarify cell fusion in the *Aoste12* deletion strain, conidial anastomosis was analyzed by the Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) system to visualize heterokaryotic cells after cell fusion[3)]. The *Aoste12* deletion strain retains the ability of conidial anastomosis, the result of which is different from those of *ste12* orthologs in other filamentous fungi. To investigate the localization of AoSte12, we constructed the strain expressing AoSte12 fused with EGFP at its C-terminus. The fluorescence of AoSte12-EGFP was detected in the nuclei and cytoplasm. We will investigate how AoFus3 and FipC regulate the localization and function of AoSte12.

1) Katayama *et al*., Annual meeting of JSBBA 2016, 2F049
2) Tsukasaki *et al.*, Biosci. Biotechnol. Biochem. 2014, Vol. 78, 1254-1262
3) Okabe *et al.*, Annual meeting of JSBBA 2016, 2F053

*Aspergillus oryzae*, cell fusion, transcription factor

発表責任者：Jun-ichi MARUYAMA（amarujun@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2C18p03
講演日時：3 月 18 日 14:30～ C 校舎 18 会場

麹菌 *A. oryzae* における細胞損傷時の AoFus3 MAP キナーゼ経路の機能解析
Functional analysis of the AoFus3 MAP kinase pathway upon cell wounding in *Aspergillus oryzae*
○原田 堅伍、矢萩 大貴、北本 勝ひこ、丸山 潤一（東大院・農生科・応生工）
○Kengo HARATA, Daiki YAHAGI, Katsuhiko KITAMOTO, Jun-ichi MARUYAMA (Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

【目的】麹菌 *Aspergillus oryzae* は多細胞生物であり、隔壁には隔壁孔という小さな穴があいており、隣接する細胞はこれを介して連絡している。この細胞間連絡は、菌糸が損傷すると隣接する細胞に溶菌が伝播する危険をはらんでいる。糸状菌に特異的に存在するオルガネラ Woronin body は隔壁孔をふさぎ溶菌の伝播を防ぐが、溶菌の伝播を防いだ後の細胞修復の機構は未解明な部分が多い。我々は以前、MAP キナーゼ(MAPK)のひとつである AoFus3 が隔壁孔を囲む局在を示し、溶菌後の再生長に関与することを報告している [1)]。さらに、AoFus3 と相互作用するタンパク質として同定した FipB も、隔壁孔を囲む局在を示し、溶菌後の再生長に関与する [1)]。FipB は、Rho GTPase を不活性型（GDP 結合型）にする RhoGAP (Rho GTPase-activating protein)ドメインをもち、AoCdc42 を標的とすることが示唆された [2)]。Fus3 MAPK 経路には、MAPKK の Ste7、MAPKKK の Ste11 が存在することが知られている。本研究では、*A. oryzae* の AoSte7 と AoSte11 の菌糸損傷後の再生長における機能に関して解析を行った。
【方法と結果】AoSte7 と AoSte11 のそれぞれの EGFP 融合タンパク質の局在を観察したところ、通常の生育条件では多くの菌糸で隔壁孔を囲む局在がみとめられた。さらにパルスレーザーを用いて菌糸を損傷させたところ、AoSte7 と AoSte11 は主に隔壁孔を囲む局在、または隔壁孔中心への局在を示すことが観察された。これは AoFus3 の局在と同様の結果であり、AoSte7 と AoSte11 は隔壁孔周辺において AoFus3 と共通の機能を果たしている可能性が考えられた。

次に、*Aoste7* 破壊株と *Aoste11* 破壊株において、パルスレーザーを用いて先端細胞を損傷させた後、2 番目の細胞での新たな菌糸の伸長による再生長を行う能力について調べた。その結果、両破壊株では再生長を示す菌糸の割合が野生型株に比べ減少していた。この結果から、AoSte7、AoSte11 は AoFus3 と同様に再生長に関与することを明らかにした。

我々は以前、*Aofus3*、*fipB* 各遺伝子の破壊により AoCdc42 が隔壁孔を囲む局在を示すようになることを明らかにしている [2)]。現在、*Aoste7* 破壊株や *Aoste11* 破壊株でも同様に、隔壁孔周辺において AoCdc42 の局在が変化するかどうかを解析している。

1) 矢萩大貴ら、2013 年度農芸化学会大会講演要旨 4B13a07
2) 原田堅伍ら、2015 年度農芸化学会大会講演要旨 3A41a15

*Aspergillus oryzae*, MAP kinase, RhoGAP

発表責任者：丸山潤一（amarujun@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2C18p04
講演日時：3 月 18 日 14:45～ C 校舎 18 会場

麹菌 *A. oryzae* の菌核形成に必須な新規転写因子の解析
Analysis of novel transcription factors required for sclerotia formation in *Aspergillus oryzae*

○藤井 陽平[1]、中村 英淳[1]、片山 琢也[1]、小川 真弘[2]、小山 泰二[2]、北本 勝ひこ[1]、丸山 潤一[1] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]野田産研)
○Yohei FUJII[1], Hidetoshi NAKAMURA[1], Takuya KATAYAMA[1], Masahiro OGAWA[2], Yasuji KOYAMA[2], Katsuhiko KITAMOTO[1], Jun-ichi MARUYAMA[1] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]Noda Inst. Sci. Res.)

【目的】
菌核は一部の糸状菌に見られる菌糸が密着・融合した凝集塊であり，耐久性の休眠構造である。麹菌 *Aspergillus oryzae* の近縁種である *Aspergillus flavus* などでは，菌核の内部に有性生殖器官を形成することが報告されている。一方，*A. oryzae* では有性世代が見つかっておらず，複数の株に由来する優良な表現型を併せもつ株を効率よく取得するための交配育種を利用することができない。有性生殖を誘導するうえで，*A. oryzae* では菌核形成能が低下もしくは消失していることが問題となっている。*A. oryzae* において菌核形成を制御する転写因子は SclR と EcdR しか報告されていなかったことから[1,2]，我々は野生株 RIB40 に由来する転写因子破壊株ライブラリーから菌核形成能が低下もしくは失われた株をスクリーニングした[3]。本研究では，なかでも菌核形成に重要な役割を果たすと考えられる新規転写因子に着目し，その機能解析を行った。

【方法・結果】
転写因子破壊株ライブラリーにおいて、コロニーの生育および分生子形成は正常であるが，菌核は全く形成しない株は 2 つあり，$Zn(II)_2Cys_6$ 型転写因子をコードする遺伝子(AO090010000784, AO090009000520)の破壊株であった。これらの遺伝子は *Aspergillus* 属に広く保存されているが，これまでに機能解析の報告はなされていない。それぞれの遺伝子について過剰発現株を作製し，形成した分生子および菌核の数を測定した。AO090009000520 過剰発現株では分生子形成数が減少し，菌核形成数が増加した。AO090010000784 過剰発現株では分生子形成への影響はみられなかったが，菌核形成数が減少した。以上の結果から，これら 2 つの転写因子は菌核形成に必須であるが，異なる制御機構により機能している可能性が考えられた。また，それぞれの C 末端側に EGFP を融合させたタンパク質を発現する株を作製し蛍光観察により局在を調べたところ，核への局在を示唆する結果が得られた。現在，転写因子遺伝子破壊株と過剰発現株において，菌核および分生子形成に関連する遺伝子の転写解析を行っている。

1) Jin *et al.*, Eukaryot. Cell 10:945-955 (2011)
2) Jin *et al.*, Fungal Genet. Biol. 48:1108-1115 (2011)
3) 中村英淳ら 第 67 回日本生物工学会大会要旨集 p.89 (2015)

*Aspergillus oryzae*, sclerotia, transcription factor

発表責任者：丸山潤一（amarujun@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2C18p05
講演日時：3 月 18 日 15:00～ C 校舎 18 会場

麹菌 *A. oryzae* の分化に関与する LaeA 様メチルトランスフェラーゼの探索と機能解析
Screening and functional analysis of LaeA-like methyltransferases involved in development of *Aspergillus oryzae*

○川田 純毅、丸山 潤一（東大院・農生科・応生工）
○Junki KAWADA, Jun-ichi MARUYAMA (Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

【目的】麹菌 *Aspergillus oryzae* は、日本の伝統的な発酵醸造食品の製造に用いられている糸状菌である。*A. oryzae* の分生子形成は光照射により抑制されるが、これは *Aspregillus nidulans* をはじめとする多くの糸状菌とは正反対の特異な応答である。さらに、*A. nidulans* の分化の制御因子である VeA は暗条件で核に多く観察され、明条件では核局在が抑制されるが、対して、我々は *A. oryzae* の AoVeA についての明暗条件による核局在パターンがこれと逆であることを明らかにした [1)]。*A. nidulans* においてメチルトランスフェラーゼ LaeA と、これに近縁な LaeA 様メチルトランスフェラーゼ LlmF, VipC, VapB は分化の制御に関与している [2,3)]。これらの LaeA 様メチルトランスフェラーゼは、明条件において VeA の核局在を抑制することが報告されている [2,3)]。*A. oryzae* の LaeA 様メチルトランスフェラーゼの機能は未知であることから、本研究ではこれらの分化における機能をもとに、明暗条件に依存して変化する AoVeA の局在を制御する因子を探索した。
【方法・結果】*A. oryzae* ゲノムデータベースより、LaeA と同様のメチルトランスフェラーゼドメインを有するタンパク質をコードする 56 遺伝子を見出だし、分子系統樹を作成した。その中でも特に、LaeA と同じ系統に属する 15 個の LaeA 様メチルトランスフェラーゼに注目し、それぞれの欠損株を作製した。*A. oryzae* の主な分化の形態は分生子形成であるが、一部の株では菌糸の凝集した構造である菌核を形成することができることから、この 2 つの分化の表現型について解析を行った。その結果、欠損させることにより分生子形成には大きく影響しないものの、菌核形成が特異的に減少する 2 つの新規な分化制御因子を見出だした。これらのメチルトランスフェラーゼと EGFP を融合したタンパク質の細胞内局在を調べたところ、ともに核と細胞質に観察された。次に、それぞれの欠損株における AoVeA の局在を解析した。その結果、野生型株では暗条件で AoVeA の核局在が抑制されていたのに対し、2 つの LaeA 様メチルトランスフェラーゼのうち一方の欠損株において暗条件にも関わらず AoVeA の核局在が多く観察された。明条件では、いずれの株も AoVeA の局在が核に多く観察された。以上の結果から、*A. oryzae* の AoVeA の暗条件における核局在の抑制に関与するメチルトランスフェラーゼを明らかにしたことで、明条件で VeA の核局在が抑制される *A. nidulans* とは正反対の光応答が分子レベルで裏付けられた。

1) 川田ら, 日本農芸化学会 2015 年度大会要旨集, 2A36a06
2) Palmer *et al.* (2013) *PLoS Genet*. **9**:e1003193. 3) Sarikaya-Bayram *et al.* (2014) *Dev. Cell* **29**:406-20

*Aspergillus oryzae*, light, development

発表責任者：丸山潤一（amarujun@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2C18p06
講演日時：3 月 18 日 15:25～ C 校舎 18 会場

# 麹菌実用株における CRISPR/Cas9 システムを用いた効率的な多重変異株取得法の確立

# Efficient mutagenesis of multiple genes by the CRISPR/Cas9 system in *Aspergillus oryzae* industrial strains

○片山 琢也[1]、藤井 渉[2]、丸山 潤一[1] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]東大院・農生科・応動)
○Takuya KATAYAMA[1], Wataru FUJII[2], Jun-ichi MARUYAMA[1] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]Dept. of Animal Res. Sci., The Univ. of Tokyo)

【背景】麹菌 *Aspergillus oryzae* は食品醸造や酵素・タンパク質の生産に用いられる産業的に重要な糸状菌であり、このような様々な用途で数多くの *A. oryzae* 実用株が使用されている。これまでに野生株である RIB40 株に由来する株では非相同末端結合に関わる *ku70* や *ligD* の欠損株が取得され、効率的な遺伝子改変が可能となっている。一方、ほとんどの実用株ではこれらの欠損株は取得されておらず、遺伝子改変に多大な労力と時間を要する。近年、効率的な遺伝子改変の方法として複数のゲノム編集技術が確立されている。そのうちの一つである CRISPR/Cas9 システムは、ヌクレアーゼ Cas9 とそれを標的部位に誘導するガイド RNA (gRNA)の 2 つからなる簡便な方法である。これまでに我々は CRISPR/Cas9 システムを *A. oryzae* の遺伝子改変技術として確立している [1)]。しかし、ゲノム編集用プラスミドの導入のために *niaD* 欠損株の作製が必要であること、変異株の取得効率が 10~20%と比較的低いことが課題であった。そこで、本研究ではゲノム編集用プラスミドを改良し、変異株取得効率の向上とプラスミドリサイクルによる多重変異株の作製を試みた。

【結果】まず、*niaD* に代わる選択マーカーとして、ピリチアミン耐性遺伝子 *ptrA* をゲノム編集用プラスミドに挿入した。さらに、プラスミドの自立複製を可能とするとされる *Aspergillus nidulans* 由来の DNA 断片 AMA1 の半分にあたる領域を挿入した。作製したプラスミドを用いて変異導入を試みた結果、RIB40 株および日本酒製造用 RIB128 株、醤油製造用 RIB915 株において 50~100%の割合で変異株が取得できた。

次に、導入したゲノム編集用プラスミドを変異株から脱落させるため、*amyB* プロモーター制御下で *Aoace2* を発現する断片をプラスミドに挿入した。*Aoace2* は分化に関わる転写因子をコードし、これまでに過剰発現によって生育が著しく低下することを示している [2)]。このプラスミドを用いて RIB128 株の標的遺伝子に変異を導入した後、*amyB* プロモーターの誘導条件で培養することでプラスミドを脱落した標的遺伝子の変異株を単離することができた。さらに、その株に別の遺伝子を標的とするゲノム編集用プラスミドを導入することによって、二重変異株の取得に成功した。以上の結果から、本研究で作製したプラスミドを用いることで、実用株において効率的に多重変異株を作製できることが示された。

1) Katayama *et al*., *Biotechnol. Lett.*, 38, 637-642, 2016
2) 中村ら、第 67 回日本生物工学会大会要旨集 p.89, 2015

*Aspergillus oryzae*, Genome editing, CRISPR/Cas9

発表責任者：丸山潤一（amarujun@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2C18p07
講演日時：3 月 18 日 15:40～ C 校舎 18 会場

麹菌 *Aspergillus oryzae* の持つ分泌型ホスホリパーゼ $A_1$ および関連リパーゼ類の機能解析
Analysis of secretory phospholipase $A_1$ and related lipases in *Aspergillus oryzae*
○中川原 千咲、菊間 隆志、有岡 学（東大院・農生科・応生工）
○Chisaki NAKAGAWARA, Takashi KIKUMA, Manabu ARIOKA (Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

【目的】ホスホリパーゼはグリセロリン脂質を加水分解する酵素であり、その分解産物は細胞間やオルガネラ間のシグナル伝達において重要な役割を果たすことが知られている。ホスホリパーゼ $A_1$（$PLA_1$）はその中でもグリセロリン脂質の *sn*-1 位のエステル結合を加水分解し脂肪酸と 2-アシルリゾリン脂質を生じる酵素であり、様々な真核生物がこの酵素を持っている。麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来の分泌型 $PLA_1$（$sPLA_1$）はすでに産業的にも利用されている酵素であるが、$PLA_1$ 活性を持つことや基本的な酵素学的性質についての報告がなされているのみであり、それ以上の詳しい性質や生理学的な役割についてはほとんど分かっていない。我々はこの酵素を PLA1-1 と命名し、またそれと最も高い相同性を示すタンパク質を PLA1-2 と命名した。本研究では麹菌における $sPLA_1$ の機能の解析を目的として、これらの酵素の酵素学的性質の解析や、破壊株の観察を行った。
【結果】PLA1-1 と PLA1-2 は共にリパーゼのコンセンサス配列（GXSXG）およびシグナル配列を有すると予測されている。またアミノ酸配列を比較したところ予測活性残基の位置やシステイン残基の位置もよく保存されていた。各遺伝子をクローニングし、麹菌において高発現させたところ、PLA1-1 は細胞外への分泌が確認された。一方、PLA1-2 は細胞外への分泌が確認されなかった。EGFP 融合 PLA1-1 および PLA1-2 発現株をそれぞれ作製し、蛍光顕微鏡により局在を観察した結果、PLA1-1 と PLA1-2 は共に隔壁や細胞壁に多く局在していた。麹菌で生産した PLA1-1 を精製し、[$^3$H]オレイン酸標識した大腸菌膜画分を基質とした活性測定を行ったところ、PLA1-1 はホスホリパーゼ活性を有し、その活性は $Ca^{2+}$非依存的であることが分かった。また、合成リン脂質を基質とした活性測定により、PLA1-1 はホスファチジルコリン（PC）とホスファチジルエタノールアミン（PE）いずれの基質に対しても $PLA_1$ 活性を示すことが明らかとなった。麹菌での精製が困難であった PLA1-2 については、MBP タグを付加し大腸菌による生産および精製を行った。得られた組換えタンパク質を用いて[$^3$H]オレイン酸標識した大腸菌膜画分を基質とした活性測定を行ったが、PLA1-2 の活性は認められなかった。次に PLA1-1 および PLA1-2 をコードする遺伝子の破壊株を作製した。生育への影響は認められなかったが、PLA1-1 破壊株では培養上清中のホスホリパーゼ活性の低下が認められた。現在、PLA1-2 がどのような基質に対して活性を有するか、これらの遺伝子の二重破壊株がどのような表現型を示すか検討中である。また、麹菌はこの他にも PLA1-1 と相同性を示すタンパク質を複数有しており、これらについても機能解析を行うことを検討している。

*Aspergillus oryzae*, phospholipid, lipase motif

発表責任者：有岡学（arioka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2C18p08
講演日時：3 月 18 日 15:55～ C 校舎 18 会場

糸状菌 *Aspergillus nidulans* の形態形成における AP2 複合体の機能解析
Functions of AP2 complex in the morphogenesis of *Aspergillus nidulans*
○金 京運、堀内 裕之（東大院）
○Jingyun JIN, Hiroyuki HORIUCHI (Univ. of Tokyo)

AP2 複合体は高等真核生物から菌類までよく保存されたα、β2、μ2、σ2の 4 つのサブユニットから成るヘテロテトラマーである。動物細胞ではクラスリン依存性エンドサイトーシスにおいて、特異的なアミノ酸配列を持つカーゴの認識、クラスリン分子の架橋及び関連タンパク質のリクルート等を介してクラスリン依存性エンドサイトーシスに関与していることが知られている。*Schizosaccharomyces pombe* においては AP2 複合体のαサブユニットの欠失によりエンドサイトーシスのダイナミクスに変化が見られることが報告されており、*Saccharomyces cerevisiae* では μ2 サブユニットの欠失により偽菌糸形成に異常が見られ、更に cell wall integrity pathway のセンサーの 1 つである Mid2 の局在にも異常が見られることが報告されている。糸状菌では菌糸生長がタンパク質分泌能、病原性等と密接に関連していることが知られており、近年ではエンドサイトーシスが菌糸の先端付近において菌糸先端生長並びに先端の細胞壁合成に関与するタンパク質の菌糸最先端部位へのリサイクリングに関与することが示唆されている。しかし、糸状菌における AP2 複合体の機能は未解明である。そこで本研究では *Aspergillus nidulans* における AP2 複合体の機能解明を目的とし、解析を行った。

*A. nidulans* における β2、μ2、σ2 サブユニットのオルソログをコードすると考えられる遺伝子をそれぞれ破壊した株を作製し、これらの表現型を解析した。どの破壊株も野生型株と比べ重篤な生育阻害を示し、分生子形成効率は野生型株の 1/3 以下に低下した。破壊株の菌糸は多分岐を示し、溶菌部位も観察された。以上のことより、これら遺伝子は生育、分生子形成及び菌糸の極性維持に関与することが示され、全ての破壊株が類似の表現型を示したことから、これらの遺伝子産物が複合体を形成して機能することが強く示唆された。細胞内における AP2 複合体の局在を検討するため、β2 サブユニットのオルソログと考えられるタンパク質の C 末端に mCherry を連結した融合タンパク質を発現する株を作製し観察した結果、菌糸先端及び亜頂端部位に蛍光が見られた。更に、AP2 複合体とエンドサイトーシスの関連性を検討するため、野生型株と μ2 サブユニットのオルソログをコードすると考えられる遺伝子破壊株の FM4-64 の取り込みについて検討した結果、両株での取り込みに大きな差異が見られなかった。現在、これら破壊株におけるキチン合成酵素の挙動について検討中である。

*Aspergillus*, endocytosis, AP2 complex

発表責任者：堀内　裕之（ahhoriu@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2C18p09
講演日時：3 月 18 日 16:10～ C 校舎 18 会場

# 放線菌プラスミド pSN22 由来 *tra* 遺伝子群ゲノム内挿入による染色体移行の解析

Analysis of chromosomal mobilization by pSN22 *tra* genes insertion

○佐藤 李花、横井 崇紘、宮武 徹、片岡 正和（信州大学大学院）
○Rika SATO, Takahiro YOKOI, Tetsu MIYATAKE, Masakazu KATAOKA (Graduate School of Shinshu Univ.)

【背景と目的】放線菌は原核生物の中でも非常に高い遺伝的多様性を持ち、多種の株が存在する。要因として、遺伝子水平伝播機構の１つである接合伝達が種間の遺伝子伝達に寄与していると考えられる。放線菌 *Streptomyces nigrifaciens* から分離された接合伝達性プラスミド pSN22 は、接合伝達に必須な遺伝子座として *traR, traA, traB, spdB* の４つを有している。これまでに *traB* 遺伝子がコードしている TraB タンパク質が DNA 輸送チャネルとして接合伝達に主要な役割を果たしていることや、TraA や SpdB タンパク質が菌糸内での DNA の拡散に関与していることが明らかとなっている。また、*traB* の下流域に存在するシス因子 *cis-acting locus of transfer*（*clt*）が高効率な接合伝達に必須であることや、プラスミド伝達に伴った宿主染色体の移行を確認してきた。染色体移行に関して先行研究では、*S. lividans* 由来接合伝達プラスミド pIJ101 の接合伝達因子 *tra* と *tra* の制御因子である *korA* を *S. lividans* の染色体へ導入することで染色体移行効率のわずかな向上が確認された。我々は、この染色体上の接合伝達関連遺伝子による染色体移行能上昇に着目し、放線菌の染色体移行によるゲノム操作系の構築を目的とした。

【方法】pSN22 由来の伝達関連遺伝子群を Actinophage phiC31 由来の部位特異的組換えを利用し *S. lividans* の染色体内へ導入した。供与菌と受容菌の混合培養により、同種菌間での染色体移行による組換え頻度の確認を行った。染色体移行の評価は供与菌から受容菌へ移行した薬剤耐性マーカーにより判別し、伝達能の定量的評価を行った。

【結果】pSN22 由来の伝達関連遺伝子群の挿入により、*S. lividans* の同種菌間において高頻度な染色体組換えが認められた。また、*S. avermitilis* を始めとした異種菌を受容菌とした場合にも伝達が起こる事を確認している。現在我々は巨大 DNA 電気泳動法であるパルスフィールドゲル電気泳動法による染色体型の解析および異種菌間伝達の定量と最適化に取り組んでいる。本大会ではこれらの結果について報告する予定である。

*Streptomyces*, conjugal transfer, pSN22

講演番号：2C18p10
講演日時：3 月 18 日 16:25～ C 校舎 18 会場

Streptomyces nigrifaciens 由来の環状プラスミド pSN22 をモデルとした、放線菌の接合伝達における必須因子 TraB の機能解析
Functional analysis of an essential protein for Streptomyces conjugation, TraB
○矢野 嵩紘、宮武 徹、横井 崇紘、片岡 正和（信州大院・理工）
○Takahiro Yano, Tetsu Miyatake, Takahiro Yokoi, Masakazu Kataoka (Shinshu Univ.)

【目的】放線菌は真性細菌でありながら高い遺伝的多様性を有する稀有な生物種である。中でも分離株の90%を占める*Streptomyces*属は、多様な二次代謝産物を生産することでも知られ、抗生物質をはじめ人類に多大な貢献をもたらしてきた。放線菌*Streptomyces*属からは生物進化に関する重要な知見が引き出せる可能性が大いにあるとともに、ゲノム上に多数の休眠遺伝子が存在することは工業生産株としての潜在能力の高さを示唆している。我々は*Streptomyces*属の進化的背景に迫るにあたり、接合伝達に着目した。*Streptomyces*属はⅣ型分泌系とは異なる特有の接合伝達機構を有し、ゲノムサイズのDNAでも効率よく輸送できることが報告されているが（Kataoka., Unpublished data）、そのメカニズムはほとんど未解明である。我々は*Streptomyces*属における接合伝達機構の詳細を調べることで細菌進化の歴史を明らかとするとともに、*Streptomyces*属における遺伝子導入法を確立し、最適な工業生産株の樹立を容易にすることができるものと考えた。これを踏まえ、我々は*Streptomyces nigrifaciens*由来の接合伝達性プラスミドpSN22をモデルに、その伝達機構の解明を行うことを本研究の目的とした。pSN22 の接合伝達ではプラスミドにコードされたTraR,TraA,TraB,SpdBが接合伝達に関与し、中でもTraBは必須因子であることが判明している（Kataoka *et al*., *J.Bacteriol*.,173:4220-4228）。我々はまずDNAチャネル本体であるTraBの機能解析に着手した。
【方法と結果】TraBは670個のアミノ酸残基から成り、機能的にN末端側から細胞膜への局在、モーター、DNAへの結合という3つのドメインに大別できることが示唆されてきた（Kosono *et al*.,*Mol Microbiol*.,19:397-405.）。まず、モータードメインはWalker NTP結合モチーフを有し、ATPase活性を示すほか、*Streptomyces*におけるTraBホモログとの相同性が高い。そこでモチーフに点突然変異を導入し、ATPase活性を野生型と比較した。その結果、点突然変異体における活性値は野生型の50%未満にまで低下し、接合伝達能との密接な相関があることが明らかとなった。続いて膜局在性に関して、TraB N末端の143残基、95残基、56残基のみをそれぞれ残したEGFP融合タンパク質発現ベクターを構築し、放線菌での可視化、及び細胞分画を行った。その結果、95残基存在すれば膜画分に局在するが、56残基では局在性を失うことが明らかとなったほか、TraBの膜局在システムは翻訳系に非依存的であることが示唆された。最後にDNAへの結合ドメインに関して、立体構造予測から結合上重要であると思われる残基にアラニン変異を導入し、遺伝的交雑法により接合伝達効率の定量を試みた。その結果についても併せて報告する予定である。

Streptomyces, conjugation, TraB

発表責任者：片岡　正和（mars@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2C18p11
講演日時：3 月 18 日 16:50～ C 校舎 18 会場

# 接合伝達を用いた異種菌間巨大 DNA 移動ツールの構築

# Construction of xenogeneic DNA transfer tool using conjugation

○恩田 翔輝[1]、横井 崇紘[1]、森 浩禎[2]、片岡 正和[1]([1]信大院、[2]奈良先端大)
○Shoki Onda[1], Takahiro Yokoi[1], Hirotada Mori[2], Masakazu Kataoka[1] ([1]Shinshu Univ., [2]NAIST)

【背景と目的】細菌は遺伝子水平移動機構の一つである接合伝達により、互いに遺伝子を交換することで遺伝的多様性を獲得している。これまでに大腸菌をはじめ、多くのグラム陰性菌、グラム陽性菌で接合伝達が確認されてきた。特に大腸菌から同定されたF因子と呼ばれる性決定因子は微生物遺伝学の発展に大きく貢献し、大腸菌研究を推進してきた。このF因子は、通常染色体とは独立に複製されるプラスミドとして存在し、F因子を持たない株と接することで伝達される。接合を行うにあたって必要な因子は、接合伝達関連タンパク質をコードしている*tra*遺伝子群とDNAの伝達起点となる*oriT*(*origin of transfer*)の2つである。F因子は染色体外因子として以外に、Hfr(High frequency recombination)株と呼ばれる宿主染色体に組み込まれた状態で存在する。Hfr株は宿主染色体を高効率に可動化し、巨大DNAを簡便かつ安定に移動させることが可能である。このHfr株を相同組換えにより作製するためのツールとして、F因子由来のCIP（Chromosomal Integration Plasmid）と名付けられたプラスミドが開発されている。しかしF因子における接合は宿主域が狭く、その対象は大腸菌と一部の細菌に限定されるため、多様な細菌の解析には適していない。

我々は接合システムをさらに広範囲な受容菌に適用するため、R 因子の一種である R388 に着目した。R388 は大腸菌から同定された広宿主域の自己伝達性プラスミドであり、種々の生物種に対して伝達されることが報告されている。

【方法と結果】R388 由来の *tra* 遺伝子群（*trw* 領域）及び *R388-oriT* を用いて、CIP を R388-CIP に改変した。接合伝達による大腸菌の Hfr 株の作製を行い、接合因子を染色体へ組み込んだ Hfr 株をホストとしたプラスミド伝達能の評価を行った。現在、枯草菌や放線菌を対象とした異種細菌に対する接合伝達の定性的評価を行っている。本大会では、これらの結果について報告を行う。

conjyugation, R388, Hfr

発表責任者：片岡正和（mars@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2C18p12
講演日時：3 月 18 日 17:05～ C 校舎 18 会場

# 微生物殺虫剤 *Bacillus thuringiensis* の巨大プラスミドの構造変化と娘細胞への分配

# Structural variation and segregation of large plasmids of microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*

○野澤 貴洋[1]、岩崎 誠[1]、武部 聡[2]、千 菊夫[1]([1]信州大・農・応用生命、[2]近畿大・生物理工)
○Takahiro NOZAWA[1], Makoto IWASAKI[1], So TAKEBE[2], Kikuo SEN[1] ([1]Fac. of Agr. , Shinshu Univ., [2]BOST, Kindai Univ.)

【背景・目的】

*Bacillus thuringiensis*（*Bt*）は，殺虫性タンパク質顆粒を生産することで知られ，微生物殺虫剤や遺伝子組換え作物の遺伝子資源として利用されている．この殺虫性タンパク質をコードする遺伝子は，同菌が保有する巨大プラスミド上に位置している．*Bt* の殺虫力を担う巨大プラスミドは遺伝的・構造的に多様であるが，同プラスミドの構造変化に関する知見は乏しい．

本研究は，*Bt* 亜種 *israelensis*（*Bti*）HD522 株がもつ巨大プラスミド pBTI-6 と *Bti* 4Q5 株がもつ pBtoxis の構造の差異に着目し，これらプラスミドの構造変化や部分構造の異なるプラスミドの分配に関する知見を得ることを目的としている．

【方法】

既に，pBTI-6 の 6.5 kb *Bam*HI 制限断片（構造変化領域）の構造が異なる別プラスミド pBTI-6Ex の存在が明らかになっている．pBTI-6Ex は，pBTI-6 に pBtoxis 特異的領域の一部（Ex 領域）が付加された pBTI-6 類似プラスミドである（2016 年度日本農芸化学会要旨集 3F082）．pBtoxis 型プラスミド・pBTI-6Ex・pBTI-6 の 3 者間の構造変化は，転移因子 IS*240*A を介した相同組換えで説明できる．pBTI-6 上には合計 8 個の IS が存在しており，それぞれの IS を増幅するプライマーセットを用いた PCR 解析を行い，これらの IS 位置でのプラスミドの構造変化の有無を調査した．

また，*Bti* HD522 株をストレスなしの条件下（PY 液体培地，30℃ 振とう培養）で長期培養（300 回以上の細胞分裂）した後，コロニーを形成させ，コロニー PCR によって pBTI-6 と pBTI-6 Ex の娘細胞への分配を調査した．

【結果・考察】

IS を起因とする構造変化は，既知の構造変化領域以外の 7 か所では認められなかった．一方，同既知領域での構造変化は，HD522 株以外の 5 種類の *Bti* 野生株においても確認された．これらの結果から，pBTI-6 の構造変化は 6.5 kb *Bam*HI 制限断片上の IS*240*A で特異的に起こっており，その構造変化は異なる単離源由来の *Bti* でも遍く起こっていると推論した．

*Bti* HD522 株は，細胞分裂を繰り返した後も pBTI-6 と pBTI-6Ex の両方を保持していた．この結果は「同一複製機構・起点をもつ異なるプラスミド間の不和合性の原理」に反しており，両プラスミドの共存を可能にする分子機構の解明が待たれる．

*Bacillus thuringiensis*, insertion sequence, plasmid segregation

発表責任者：千　菊夫（kik1000@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2C18p13
講演日時：3 月 18 日 17:20～ C 校舎 18 会場

アグロバクテリウムを用いた担子菌ウシグソヒトヨタケの形質転換
*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of basidiomycete *Coprinopsis cinerea*
○吉田 佳奈子[1]、須貝 友紀[1]、西尾 智裕[1]、下坂 誠[2]、千 菊夫[1]([1]信州大・農・応用生命、[2]信州大・繊維・生物機能)
○Kanako YOSHIDA[1], Yuki SUGAI[1], Tomohiro NISHIO[1], Makoto SHIMOSAKA[2], Kikuo SEN[1]
([1]Fac. of Agr., Shinshu Univ., [2]Fac. of Textile Sci. & Tech., Shinshu Univ.)

【目的】 従来，担子菌の形質転換法としてプロトプラスト - ポリエチレングリコール法が用いられてきた．しかし，担子菌においてはプロトプラスト調製の操作が煩雑で，細胞壁の再生率も低いため，形質転換効率が非常に低いのが実情である．そこで菌類では，同法に代わって実験操作が簡便な ATMT（*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation）法が導入されつつある．担子菌類においてもこの方法による形質転換がいくつかの菌種で報告されているが，種々の担子菌で有効かどうかは不明である．
本研究の目的は，モデル担子菌ウシグソヒトヨタケ（*Coprinopsis cinerea*）への外来遺伝子導入法として ATMT 法を検討し，その形質転換条件を決定することである．
【方法】 *C. cinerea* 交配因子変異株#326，*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 株/バイナリーベクターpFungiwayEH-2DsRed（真核生物でのマーカー：ハイグロマイシン B 耐性，DsRed 発光）を実験に供した．ATMT 法の実験操作手順は以下の通りである．
1)前培養:アグロバクテリウムを 40 μg/mL クロラムフェニコール含有 MM 液体培地で，ウシグソヒトヨタケを MYG 平板培地で，それぞれ前培養した．2）誘導培養：前培養終了後の両菌を集菌し，濃度を調整してから，200 μM アセトシリンゴン含有 IM（または MYG）液体培地で，それぞれ誘導培養した．3）共培養：200 μM アセトシリンゴン含有 IM 平板培地にセロハン膜を貼り付け，両菌の培養液をそれぞれ 200 μL ずつ塗布し，28℃，96 時間共培養した．4）選択培養：セロハン膜ごと 200 μg/mL セフォタキシム，25 μg/mL ハイグロマイシン B 含有 MYG 培地に移し，28℃，2～3 週間選択培養した．5）蛍光顕微鏡観察：抗生物質含有培地で選抜した形質転換体コロニーの菌糸細胞内における蛍光レポーター*DsRed* 遺伝子の発現を蛍光顕微鏡で観察した．
【結果】 誘導培養時のウシグソヒトヨタケの液体培地と菌糸濃度，アグロバクテリウム細胞濁度に着目し，ATMT 法の条件検討をした．ウシグソヒトヨタケの誘導培養培地を MYG に変更，菌糸濃度を 2～14 mg/mL に，アグロバクテリウム細胞濁度を $OD_{600}$ 0.06～0.12 に調整して実験したところ，ハイグロマイシン B 耐性形質転換体コロニーを得ることに成功した（1～24 コロニー/プレート）．形質転換体細胞内に DsRed の蛍光発色を確認できたため，目的の DNA 断片が導入され，レポーター遺伝子が発現していると判断した．

*Coprinopsis cinerea*, transformation, *Agrobacterium tumefaciens*

発表責任者：千　菊夫（kik1000@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2C18p14
講演日時：3 月 18 日 17:35～ C 校舎 18 会場

IncP-9 群プラスミドの接合伝達に関わる全遺伝子の同定
Identificaition of novel conjugative transfer gene in IncP-9 plasmid
○岸田 康平、ルーカス ティム、大坪 嘉行、永田 裕二、津田 雅孝（東北大院生命）
○Kohei Kishida, Tim Lukas, Yoshiyuki Ohtsubo, Yuji Nagata, Masataka Tsuda (Tohoku Univ.)

【背景・目的】プラスミドの接合伝達による遺伝子の水平伝播は微生物の多様な環境への適応進化に大きく貢献している。自己伝達性プラスミドの伝達装置は共通した 2 つのシステムにより成り立つと理解されている。その 2 つは、relaxase を中心とした供与菌内で接合伝達開始領域である *oriT* から一本鎖 DNA (ssDNA)を生成する Dtr (DNA transfer and replication)システム、供与菌と受容菌細胞同士を連結する接合対を合成する Mpf (mating-pair formation)システムであり、各種の接合伝達性プラスミドでこれらシステムに関連する 14 遺伝子が保存されている。一方、これまでこれら遺伝子と *orT* を有すプラスミドの接合伝達能の検討した実験は皆無であった。さらに、接合伝達研究が最も進んでいる IncW プラスミド R388 にはこれらシステムに含まれていない *stbB* が接合伝達必須遺伝子として同定されている。また、我々の研究室では、IncP-9 群に属するナフタレン分解プラスミド NAH7 の *traF* が接合伝達必須遺伝子として同定しており、接合伝達に関わる未知のシステムが存在する可能性が考えられた。そこで、我々は、NAH7 上の接合伝達関連遺伝子を全て同定することを目的とした研究を行なった。
【結果・考察】NAH7 上に存在する 3 つの接合伝達関連オペロンと *oriT* をクローニングしたプラスミド pKKO1 を作製した。pKKO1 保持株を供与菌として接合伝達試験を行なったが、接合伝達体は出現しなかった。この結果から NAH7 上にはこれら接合伝達関連オペロン以外に「接合伝達に必須な未知遺伝子の存在」が示唆された。本未知遺伝子を同定するために、λ/red recombination system を用いて接合伝達関連オペロン以外を大規模欠失した NAH7 誘導体を複数作製し、接合伝達能を失った NAH7 誘導体を探索した。その結果、*mpf* オペロンの下流に存在する *orf30* から *orf34* の 5 *orf* を欠失した NAH7 は、接合伝達能を消失していた。次に、これら *orf* を単独に破壊した NAH7 の接合伝達試験を行い、*orf34* を破壊した NAH7 誘導体(以後、NAH7Δ34 と示す)のみが接合伝達能を失っていた。さらに pUC18::*orf34* と NAH7Δ34 保持株を供与菌とした場合、NAH7Δ34 は接合伝達可能であった。この株は pUC18 と NAHΔ34 の保持株と比較して、著しい生育の遅れがあることがわかり、「*orf34* は接合伝達に必須であるが、生育阻害を促す遺伝子」であると考えられた。また、*in silico* 解析より *orf34* ホモログは IncP-9 群プラスミドだけでなく、R388 を含む多くのプラスミドで保存されていた。現在、Orf34 の機能解明を目指し、細胞局在解析と Bacterial Adenylate Cyclase Two Hybried 法を用いた Orf34 と接合伝達関連タンパク質の相互作用検出を行っている。

plasmid, conjugative transfer, horizontal gene transfer

発表責任者：岸田康平（kishida@ige.tohoku.ac.jp）

講演番号：2C18p15
講演日時：3 月 18 日 17:50～ C 校舎 18 会場

*Sphingobium* sp. SYK-6 株における β-aryl ether 代謝中間体・ β-hydroxypropiovanillone 変換酵素遺伝子の機能解析
Characterization of the β-hydroxypropiovanillone catabolism gene in *Sphingobium* sp. strain SYK-6

○樋口 雄大[1]、竹浪 寛樹[1]、青木 翔吾[1]、上村 直史[1]、菱山 正二郎[2]、笠井 大輔[1]、片山 義博[3]、福田 雅夫[1]、政井 英司[1] ([1]長岡技科大・生物、[2]森林総研、[3]日大・生資科)
○ Yudai HIGUCHI[1], Hiroki TAKENAMI[1], Shogo AOKI[1], Naofumi KAMIMURA[1], Shojiro HISHIYAMA[2], Daisuke KASAI[1], Yoshihiro KATAYAMA[3], Masao FUKUDA[1], Eiji MASAI[1] ([1]Nagaoka Univ. Tech., [2]FFPRI, [3]Nihon Univ.)

【目的】*Sphingobium* sp. SYK-6 株は、様々なリグニン由来の二量体及び単量体化合物を唯一の炭素源、エネルギー源として生育する。リグニンの分子間結合の内、β-aryl ether 結合は約 50%を占める最も主要な結合であることから、微生物によるβ-aryl ether 化合物の代謝系を明らかにすることは、リグニン生分解機構を解明し、リグニンからの有用物質生産系を確立する上で重要である。SYK-6 株において、β-aryl ether のモデル化合物である guaiacylglycerol-β-guaiacyl ether (GGE) は Cα位の酸化及びエーテル開裂を経て、β-hydroxypropiovanillone (HPV)に変換される。2009 年度の本大会において、HPV は Cγ位アルコールが酸化され、vanilloyl acetaldehyde (VAL)、vanilloyl acetic acid (VAA)を経由して代謝されることを報告した。また、glucose-methanol-choline oxidoreductase family に属し、HPV の変換能を宿主に与える酵素遺伝子 *hpvZ* を単離したことを報告した。本研究では、*hpvZ* の機能を明らかにすることを目的とした。
【方法】SYK-6 株の *hpvZ* を相同組換えによって破壊し、破壊株の休止細胞を用いて HPV 変換活性を調べた。HPV 変換活性は HPLC 分析によって HPV の減少量を測定することで調べ、HPV の変換産物は LC-MS を用いて調べた。*E. coli* を宿主として *hpvZ* を発現させ、得られた細胞抽出液を超遠心によって細胞質画分と膜画分に分画し、各画分の HPV 変換活性を調べた。また、膜画分を用いて、至適温度、至適 pH 及び基質特異性などの酵素学的諸性質を調べた。至適温度と至適 pH はそれぞれ 25~50°C、pH7.0~10.0 の範囲で調べた。基質特異性の解析には、GGE などのリグニン由来二量体化合物及び coniferyl alcohol や sinapyl alcohol などの単量体の芳香族アルコール基質を用いた。
【結果】SYK-6 株の *hpvZ* 破壊株を作製し、HPV 変換能を調べた結果、本株は HPV 変換能を完全に欠損していた。このことから、SYK-6 株における HPV の変換には *hpvZ* が必須であることが明らかとなった。*hpvZ* を高発現させた *E. coli* の細胞抽出液と HPV を反応させ、反応産物を LC-MS で分析した結果、HpvZ によって HPV が VAL に変換されることが示された。*hpvZ* を発現した *E. coli* の細胞抽出液から、膜画分と細胞質画分を調製し、HPV 変換活性を調べたところ、HpvZ は細胞膜に局在することが示された。組換え体の細胞抽出液から HpvZ の His タグ精製を試みたが、Ni 担体への吸着がほとんど見られなかったため、組換え体の膜画分を用いて酵素学的諸性質を調べた。その結果、本酵素の至適温度と至適 pH は、それぞれ 40~45°C 及び pH8.5~9.0 であり、C6-C3 構造を有する芳香族アルコールに対して特異性を有することが明らかとなった。

lignin, β-aryl ether, glucose-methanol-choline oxidoreductase

講演番号：2C18p16
講演日時：3 月 18 日 18:05～ C 校舎 18 会場

*Sphingobium* sp. SYK-6 株におけるリグニン由来ビフェニル型化合物代謝系遺伝子の転写制御システム
Transcriptional regulation of the catabolic genes of a lignin-derived biphenyl compound *Sphingobium* sp. strain SYK-6
○新沼 皐[1]、荒木 拓馬[1]、上村 直史[1]、笠井 大輔[1]、片山 義博[2]、福田 雅夫[1]、政井 英司[1]([1]長岡技科大・生物、[2]日大・生資科)
○ Ko NIINUMA[1], Takuma ARAKI[1], Naofumi KAMIMURA[1], Daisuke KASAI[1], Yoshihiro KATAYAMA[2], Masao FUKUDA[1], Eiji MASAI[1] ([1]Nagaoka Univ. Tech., [2]Nihon Univ.)

【緒言・目的】さまざまなリグニン二量体化合物を分解する *Sphingobium* sp. SYK-6 株は、リグニン由来ビフェニル型化合物である 5,5′-デヒドロジバニリン酸 (DDVA)を脱メチルし、芳香環開裂、側鎖開裂および脱炭酸の後、バニリン酸 (VA)を経由して代謝する (Masai et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2007)。SYK-6 株は VA 代謝過程で工業的に有用な原料化合物を産生するため、本株の持つ多様なリグニン代謝系酵素遺伝子の機能とその転写制御機構を解明することは、リグニンからの有用物質生産系の構築に有用である。当研究室で実施された DNA マイクロアレイ解析により、DDVA 代謝に関わる一部の酵素遺伝子は DDVA 存在下で誘導されることが示された。これらの遺伝子はゲノム上でクラスターを形成しており、本クラスター内に存在する MarR 型転写制御因子と相同性を示す SLG_07780 (*ddvR*)によって制御されていることが示唆されている (吉方ら, 日本農芸化学会 2013 年度大会)。本研究では、SYK-6 株における DDVA 代謝系遺伝子群の転写制御機構の解明を目的として、DDVA 代謝系遺伝子クラスターの転写単位の同定とこれら遺伝子の転写誘導性の評価、ならびに DdvR の転写制御への関与について解析を行った。

【材料・方法】5 mM DDVA または VA 存在下／非存在下で培養した SYK-6 株から全 RNA を単離し、逆転写 (RT)反応により cDNA を合成した。得られた cDNA を用いて RT-PCR 解析を行い、DDVA 代謝系遺伝子クラスターの転写単位を調べた。クラスター中の DDVA 代謝系遺伝子については、定量的 RT-PCR (qRT-PCR)解析を実施し、転写誘導性を評価した。*ddvR* 遺伝子破壊株由来 cDNA を用いて各遺伝子の qRT-PCR 解析を行い、DdvR の転写制御への関与を調査した。

【結果・考察】DDVA 代謝系遺伝子の qRT-PCR 解析の結果、DDVA 代謝に必須な酵素遺伝子である *ligXa* (SLG_07770)、*ligZ* (SLG_07720)および *ligY* (SLG_07750)は DDVA 誘導的に発現することが示された。また RT-PCR 解析によって、DDVA 代謝系遺伝子クラスターは、*ligZ* と *ligY* を含む 11 個の遺伝子と *ligXa*-SLG_07760 の 2 つのオペロンから構成されていることが明らかとなった。*ddvR* 破壊株を用いた qRT-PCR 解析の結果、*ddvR* 破壊株の非誘導時における *ligXa*、*ligY* および *ligZ* の転写量は野生株の非誘導時と比較して顕著に高いことが示された。したがって、DdvR は 2 つの DDVA 代謝系オペロンの転写を負に制御するリプレッサーであることが強く示唆された。

lignin, biphenyl, transcriptional regulation

講演番号：2C19a01
講演日時：3 月 18 日 09:20～ C 校舎 19 会場

高シュウ酸植物を摂食するハムシ腸内フローラの特性解析
Characterization of gut microbiota of leaf beetles feeding on oxalate-rich plants
○大坪 和香子[1]、宮城 敦子[2]、クワン　フー　リー マイケル[1]、森 宙史[3]、黒川 顕[3]、小島 紀幸[4]([1]東北大農、[2]埼玉大理工、[3]国立遺伝研、[4]東北学院中高)
○ Wakako Ikeda-Ohtsubo[1], Atsuko Miyagi[2], Michael Kwan Fu Lee[1], Hiroshi Mori[3], Ken Kurokawa[3], Noriyuki Ojima[4] ([1]Tohoku Univ., [2]Saitama Univ., [3]National Institute of Genetics, [4]Tohoku Gakuin High School)

コガタルリハムシ（*Gastrophysa atrocyanea*）やイチゴハムシ（*Galerucella grisescens*）は、毒性の水溶性シュウ酸を高濃度に含む外来雑草エゾノギシギシ（*Rumex obtusifolius*）を旺盛に摂食するため、体内においてシュウ酸を分解する機構が必要であると考えられる。先行研究において、コガタルリハムシの腸内共生細菌のシュウ酸分解への関与が示唆されたことから、本研究ではコガタルリハムシおよびイチゴハムシの腸内に存在する細菌群集構造について、非培養依存的（T-RFLP、クローン解析、メタゲノム解析）および培養依存的手法を用いて解析し、結果を比較した。両ハムシの腸内フローラは、腸内細菌科（*Enterobacteriaceae*）が優勢化しているという点で共通しており、卵からはこれらの細菌が検出されなかったことから、シュウ酸分解能力のある細菌をエゾギシギシ葉や根圏など環境中から獲得していることが考えられた。また、シュウ酸を単一の炭素源として供与した培地を用いた単離培養で得られた菌株について、16S rRNA 遺伝子による菌種同定を行ったところ、*Pseudomonas* 属が優勢であったが、非培養依存的手法においてコガタルリハムシ腸内に優勢的に見出された *Rahnella* 属の未培養グループに分類される系統型も見出された。今後、これらの細菌株のシュウ酸分解能や共生機能を明らかにすることにより、ハムシの高シュウ酸植物に対する摂食特異性のメカニズムの解明が期待される。

gut microbiota, oxalate, leaf beetles

発表責任者：大坪和香子（wakako.ohtsubo@tohoku.ac.jp）

講演番号：2C19a02
講演日時：3 月 18 日 09:35～ C 校舎 19 会場

*Bifidobacterium bifidum* 菌株間におけるヒトミルクオリゴ糖資化様式および関連酵素の保存性
Conservation of the metabolic behavior and the related enzymes on human milk oligosaccharides among *Bifidobacterium bifidum* strains

○後藤 愛那[1]、山田 千早[1]、苫米地 祐輔[2]、廣瀬 潤子[3]、朝隈 貞樹[4]、浦島 匡[5]、北岡 本光[4]、栗原 新[2]、山本 憲二[2]、原田 岳[6]、何 方[6]、加藤 紀彦[1]、片山 高嶺[1] ([1]京大生命、[2]石川県大、[3]滋賀県大、[4]農研機構、[5]帯蓄大、[6]タカナシ乳業)
○ Aina GOTOH[1], Chihaya YAMADA[1], Yusuke TOMABECHI[2], Junko HIROSE[3], Sadaki ASAKUMA[4], Tadasu URASHIMA[5], Motomitsu KITAOKA[4], Shin KURIHARA[2], Kenji YAMAMOTO[2], Gaku HARATA[6], Fang HE[6], Toshihiko KATOH[1], Takane KATAYAMA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Ishikawa Pref. Univ., [3]Univ. of Shiga Pref., [4]NARO, [5]Obihiro Univ., [6]Takanashi Milk Products Co.)

【背景】主要腸内細菌の一種であるビフィズス菌は、健康増進に深く関わることが知られている。特に、乳児期の腸内ではビフィズス菌が最優先菌となり、未熟な乳児の感染症防御、免疫獲得や消化を補助すると考えられているが、この現象はヒトにのみ見られる特徴である。そのため、乳児期におけるビフィズス菌優占細菌叢形成メカニズムを解明することは、ビフィズス菌とヒトの共進化の理解や、健康増進のためにビフィズス菌を腸内で増やす方法の探索においても重要である。近年の研究で、母乳中に含まれるオリゴ糖（Human milk oligosaccharides, HMOs）がビフィズス菌を選択的に増殖させる因子であることが明らかになってきた。同時に、乳児腸内に生息する主な 4 種のビフィズス菌（*Bifidobacterium bifidum*、*B. breve*、*B. longum* subsp. *longum*、*B. longum* subsp. *infantis*）の HMOs 資化様式もそれぞれ異なることが明らかとなってきた(Asakuma et al. 2011)。*B. longum* subsp. *infantis* は HMOs を菌体内に取り込んでから分解する一方、*B. breve* や *B. longum* subsp. *longum* は HMOs のコア構造である lacto-*N*-tetraose やその分解物である lacto-*N*-biose I を資化するが、フコシル化オリゴ糖の資化性は菌株依存的である。これに対し、*B. bifidum* は菌体外酵素を多数持ち、菌体外で HMOs を単糖あるいは 2 糖にまで分解する。これら分解物は *B. bifidum* 自身に取り込まれるが、一部は培養上清中に残されるため、ビフィズス菌間で cross-feeding が行われている可能性が示唆されている。実際に、*B. bifidum* が 10%以上存在する乳児腸内でビフィズス菌全体の割合が高いこと（Tannock et al. 2013）、ムチン糖鎖あるいは HMOs 由来シアル酸がビフィズス菌種間 cross-feeding に関わることが示されており（Egan et al. 2010 & Egan et al. 2014）、*B. bifidum* のオリゴ糖第一分解者および分解物供給者という役割が注目されている。本研究では *B. bifidum* に特徴的な HMOs 分解資化様式、および関連酵素等が菌株間でも保存されているかを検証した。

【結果】*B. bifidum* JCM1254 株と乳児糞便中から単離された JCM7004、TMC3108、TMC3115 の 3 株を比較した。HMOs 添加培地中で 4 株を培養し、培養上清中の HMOs 組成変化を HPLC 分析により解析した。その結果、生育および HMOs 資化速度に多少差はあるものの、全株が HMOs 添加培地で十分に生育し、Lactose、lacto-*N*-biose I を一時的に培地中に蓄積させる特徴が共通していた。fucose と galactose については、利用されずに培地中に残存していた。

【結論】*B. bifidum* の HMOs 分解様式が、菌株間で保存される性質であることを明らかにした。この結果は、今後 *B. bifidum* を HMOs の第一分解者・分解物供給者とした cross-feeding の詳細を解析する上で基盤となるものである。

human milk oligosaccharide, Bifidobacterium bifidum, metabolism

講演番号：2C19a03
講演日時：3 月 18 日 09:50～ C 校舎 19 会場

プロバイオティクス細菌を特異的に増殖させる次世代型プレバイオティクス・ガラクトシル-β-1,4-ラムノースの開発と偽膜性腸炎原因菌 *Clostridium difficile* の生育抑制

Development of next generation prebiotic galactosyl-β-1,4-rhamnose that is exclusively utilized by probiotic bacteria and suppression of growth of *Clostridium difficile* causing pseudomembranous colitis.

○平野 里佳[1]、阪中 幹祥[1]、杉本 直久[2]、江口 省吾[2]、奈良 未沙希[1]、片山 高嶺[1,3]、北岡 本光[4]、中井 博之[2]、栗原 新[1] ([1]石川県大生資環、[2]新潟大農、[3]京大生命、[4]農研機構・食品研)

○Rika HIRANO[1], Mikiyasu SAKANAKA[1], Naohisa SUGIMOTO[2], Syogo EGUCHI[2], Misaki NARA[1], Takane KATAYAMA[1,3], Motomitsu KITAOKA[4], Hiroyuki NAKAI[2], Shin KURIHARA[1] ([1]Ishikawa Prefectural Univ., [2]Niigata Univ., [3]Kyoto Univ., [4]NARO)

【背景】ヒトは腸管内に自らの 10 倍の細胞数、150 菌種以上の細菌からなる複雑な腸内細菌叢を保持しており、腸内細菌叢バランスの崩壊は健康寿命の伸長を阻むと考えられる。このバランスを良好に保つために、ビフィズス菌・乳酸菌に代表されるプロバイオティクス細菌や、これらプロバイオティクス細菌を腸管内で増殖させる目的で経口摂取されるプレバイオティクスが用いられる。近年では腸内細菌叢バランスを劇的に改善する目的で行われる糞便移植が *Clostridium difficile* の異常増殖の結果発症する難治性腸疾患である偽膜性腸炎の治療に用いられている。本研究では「腸内常在菌を増殖させず、プロバイオティクス細菌のみを増殖させる。」という、これまでにない特徴を持つ次世代型プレバイオティクスの開発とその応用を目指して候補物質のスクリーニングと解析を行った。

【実験方法・結果】既存プレバイオティクスを含む数十種類のオリゴ糖について、腸内常在菌最優勢 13 種（*Nature*, 2010, 464:59–65）、食中毒の原因菌 *Clostridium perfringens* およびプロバイオティクス細菌による資化性を解析した。既存プレバイオティクスを含む試験したオリゴ糖の大部分は、プロバイオティクス細菌に加えて数種の常在細菌等も増殖させたが、本研究グループが大量合成・生産技術を有するガラクトシル-β-1,4-ラムノース （Galβ1,4Rha）は、*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* をはじめとしたプロバイオティクス細菌のみを選択的に増殖させることが明らかとなった。次に、Galβ1,4Rha の *B. infantis* に対する選択的増殖効果により、偽膜性腸炎の原因菌である *C. difficile* の増殖が抑制されることを示す目的で 2 菌を用いた共培養を行った。この結果、Galβ1,4Rha を共培養系に添加した時の *C. difficile* の生菌数は、非添加時の 3000 分の 1 に抑制された。腸管内で異常増殖した *C. difficile* はディフィシル毒素を細胞外に放出して宿主にダメージを与えるが、このディフィシル毒素はGalβ1,4Rhaを添加して*B. infantis*と共培養した培養上清中には検出されなかった。毒素生産の抑制は、乳児糞便懸濁液を添加して上記と同様の共培養を行った際でも観察された。

【考察】Galβ1,4Rha は、*in vitro* では有害菌やヒト健康への影響が明らかとなっていない腸内常在菌を増殖させず、プロバイオティクス細菌のみを増殖させることが可能である。また、多種多様な細菌の共存下でも偽膜性腸炎の原因菌である *C. difficile* の増殖を抑制できたことから、食品用途に使用可能な製造技術が開発されれば画期的な次世代型プレバイオティクスとなる可能性を有する。

【謝辞】本報告の一部は農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業 25010A 及び公益財団法人発酵研究所（IFO）の寄附講座助成による成果である。

probiotics, prebiotics, *Clostridium difficile*

発表責任者：栗原新（kuri711@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：2C19a04
講演日時：3 月 18 日 10:05～ C 校舎 19 会場

二種の腸内細菌の共培養によって明らかになったデオキシコール酸生成の活性化と新たな生成経路
Co-culture of Two Bile Acid-converting Intestinal Bacteria Reveals a Novel Pathway and Synergistic Effects on the Formation of Deoxycholic Acid
タオテープ サリンヤ、鳥居 剛史、山崎 真侑、吹谷 智、○横田 篤（北大院農）
Sarinya Tawthep, Tsuyoshi Torii, Mayu Yamazaki, Satoru Fukiya, ○Atsushi Yokota (Hokkaido Univ.)

＜目的＞

ヒトの代表的な一次胆汁酸であるコール酸(CA)は, 腸内での菌数が少ない限られた種の *Clostridium* 属細菌によって，デオキシコール酸（DCA）に変換される一方，腸内の優占菌種である *Bacteroides* 属に代表される様々な細菌種によって，7-oxo-デオキシコール酸 (7-oxo-DCA)にも変換される．しかしながら，ヒト大腸の胆汁酸組成を見ると，DCA は 34%を占めるのに対して，7-oxo-DCA は 1%以下を占めるにすぎず，両者の変換菌の存在量とは非常に対照的である．本研究では，腸内細菌叢の制御因子の一つであり，肝がんや大腸がんの発がん物質とされる DCA が腸内で優位に蓄積する機構を明らかにすることを目的として，DCA 生成菌と 7-oxo-DCA 生成菌との相互作用の影響を解析した．

＜実験方法＞

*Bacteroides nordii* C5 および *Bacteroides fragilis* ADB77 を 7-oxo-DCA 生成菌として，*Clostridium scindens* G10 および *Clostridium hiranonis* JCM 10541$^T$ を DCA 生成菌として使用し，0.1mM の CA を含む改変 PY 培地を用いて，嫌気条件下・37℃で単独培養および共培養を行った．二段階培養では，まず *B. nordii* または *B. fragilis* を 1mM の CA を含む GAM 培地で培養した．その後 7-oxo-DCA 生成菌の菌体を除去し，得られた培地に *C. scindens* または *C. hiranonis* を接種し，二段階目の培養を行った．経時的な菌の生育は濁度（$OD_{660}$）により測定し，胆汁酸は UPLC-MS を用いて定量分析を行った．

＜結果と考察＞

*C. scindens* と *B. nordii* および *C. hiranonis* と *B. fragilis* の共培養試験において，*C. scindens* および *C. hiranonis* の単独培養の場合と比べて，およそ 30%高い DCA の生成率が観察された．これらの結果から，共培養によって DCA 生成に相乗効果がもたらされたと考えられた．さらに *B. nordii* と *B. fragilis* の単独培養では，7-oxo-DCA の生成率が 70%以上あったのに対し，共培養では数%程度に低下したことから, 我々は DCA 生成菌が CA に加えて 7-oxo-DCA を基質として, DCA を生成するのではないか，という仮説を立てた．これを検証するために，二段階培養を行った結果，最初の培養で 7-oxo-DCA 生成によって生成した 7-oxo-DCA は，DCA 生成菌によって CA に再変換され，その後 DCA へと変換されることが観察された. これらの結果から, DCA 生成の新たな経路が存在することが明らかになった．本研究で見いだされた，腸内細菌間の相互作用による DCA 生成の活性化と新たな DCA 生成経路は，菌数の少ない DCA 生成菌が腸内で有意に DCA を蓄積できる機構の一つであると考えられる．

intestinal bacteria, bile acid transformation, deoxycholic acid

発表責任者：横田篤（yokota@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：2C19a05
講演日時：3 月 18 日 10:20～ C 校舎 19 会場

野菜類における有用共生細菌 *Variovorax* sp.の局在性と生育への影響
Plant tissue localization and effect on growth of the useful symbiotic bacteria *Variovorax* sp. in vegetables

○田上 桃子[1]、Natsagdorj Oyungerel[1,2]、Dolores Santiago Christine M.[1,2]、坂本 寿代[1]、O. Santiago Dennis Marvin[1]、岡崎 和之[3]、池田 成志[3]、大和田 琢二[1,2]（[1]帯畜大、[2]岩手連大、[3]農研機構・北農研）
○ Momoko TANOUE[1], Oyungerel Natsagdorj[1,2], Christine M. Dolores Santiago[1,2], Hisayo SAKAMOTO[1], Dennis Marvin O. Santiago[1], Kazuyuki OKAZAKI[3], Seishi IKEDA[3], Takuji OHWADA[1,2] ([1]Obihiro Univ., [2]Iwate Univ., [3]NARO・HARC)

【目的】
植物共生細菌は植物体組織（根・茎・葉）に存在し，植物の生育促進や環境ストレス耐性の向上など，宿主植物と相利共生関係を築くことが知られている。共生細菌を用いた微生物資材を活用することにより，農薬や化学肥料の使用が軽減され，地球環境に優しい農業の推進が期待される。
テンサイと親和性の高い有用共生細菌が農研機構北海道農業研究センター（北農研：芽室研究拠点）で単離され，その中から共生に有利な生化学的特性を持つ共生細菌が選抜された。本研究では、選抜された共生細菌の各種野菜類における組織局在性や生育に与える影響を調べ、野菜類の微生物資材への活用の可能性を検討した。
【方法・結果】
菌株には，テンサイから単離・選抜された HRRK170（*Variovorax* sp.）を用いた。HRRK170 の標識株はレポーター遺伝子（*gus*）を導入して作製した。野菜類にはテンサイ，ハクサイ，ピーマン，レタス，ダイコン，ナス，トマト，キャベツの 8 種類を用いた。種子を常法により殺菌処理後，寒天培地（終濃度 1.5%）に播種して発芽させた。実生を新たな寒天培地（終濃度 0.3%，Hyponex 希釈液を含む）に移植し，同時に滅菌蒸留水で調製した菌液（$10^8$ cells/ml）を接種した。栽培後（Biotoron，明期 23.5℃，暗期 20.0℃），接種菌体の GUS 染色を行って菌体を可視化させ，顕微鏡（実体顕微鏡，走査型顕微鏡（SEM））を用いてその植物体組織における局在、および感染過程を観察した。GUS 染色は基質 X-Gluc（終濃度 0.01%）を含む緩衝液中，30℃で 2 時間発色反応させた。
HRRK170 標識株を各種野菜類に接種して、植物体組織（主に根）における菌体の局在を GUS 染色、及び SEM により観察した。その結果，接種後 1～2 週間で全ての野菜類への感染が確認された。感染の程度は野菜の種類により異なる傾向が見られたが、HRRK170 は様々な野菜類を宿主として相利共生関係を構築できる可能性が明らかになった。また，野菜類における局在性は主に 3 つのパターンに分けられ、局在性は接種後数日間という短期間に決定されると考えられた。更に、感染の程度が強いハクサイを用いて品種間における組織局在性を比較した結果、局在性は品種が異なっても大きな影響は受けないことが示された。
本研究の成果は、農林水産省の「気候変動プロ」(2011～2013 年度)、及び「農食事業(26065B)」(2014～2016 年度)で得られた。

endophyte, plant tissue localization

講演番号：2C19a06
講演日時：3 月 18 日 10:45～ C 校舎 19 会場

植物の生理機能を制御する好熱菌群、並びに根圏微生物群の微生物群集構造解析
Thermophilic- and rhizosphere-microbial structure to modulate plant physiological functions.
○宮本 浩邦[1,2,3]、須田 亙[2,4]、堀内 三吉[5]、岩田 菖子[1]、松浦 真紀子[1,3]、西内 巧[6]、澤田 有司[7]、平井 優美[7]、服部 正平[8]、児玉 浩明[1]（[1]千葉大融合、[2]慶應大医、[3]サーマス、[4]東京大院新領域、[5]東京医科歯科大院医歯、[6]金沢大学際、[7]理研 CSRS、[8]早大先進理工）
○Hirokuni MIYAMOTO[1,2,3], Wataru SUDA[2,4], Sankichi HORIUCHI[5], Shoko IWATA[1], Makiko MATSUURA[1,3], Takumi NISHIUCHI[6], Yuji SAWADA[7], Yumi HIRAI[7], Masahira HATTORI[8], Hiroaki KODAMA[1] ([1]Chiba Univ., [2]Keno Univ., [3]Sermas, [4]Tokyo Univ., [5]Tokyo Medical and Dental Univ., [6]Kanazawa Univ., [7]RIKEN CSRS, [8]Waseda Univ.)

*Bacillaceae*を主体とした好熱菌群によって海産資源を75℃前後で発酵した産物は、動植物の生理機能に影響を与える。当該発酵産物を土壌に添加することによって植物体内の硝酸態窒素含量が低下するとともに（***Appl. Microbiol. Biotechnol.***, **97**:1349-1359, 2013）、アミノ酸濃度の増加傾向や生体防御関連遺伝子を発現させる傾向などについて報告した（2012～2013年・日本農芸化学会）。本研究では、発酵産物を施用した栽培条件における植物体内の代謝物と根圏微生物の群集構造との関係をオミックス解析を用いて推察した。モデル植物としてアラビドプシスを栽培し、メタボローム解析を実施した結果、発酵産物を添加した区では、植物体内の一部のアミノ酸、抗菌物質、並びにポリフェノール類が増加していた。そこで、土壌の菌叢を16SrDNAを対象として次世代シーケンサーによって網羅的に解析したところ、Classレベルにおいて、一部のGammaproteobacteria、Betaproteobacteria、Alphaproteobacteria、並びにBacilliが、発酵産物添加区の菌叢においてポピュレーションを増加させる傾向があった。これらの菌群を、発酵産物中のバクテリアと比較した結果、発酵産物中から16SrDNAの配列上、Bacilli に属する2種類の*Peanibacillus* sp.を見出した。これらの2種類の菌株の全ゲノム解析を実施し、contig配列をKEGGで解析した結果、糖質代謝や窒素代謝などに関わる幾つかの遺伝子群を保有していることが明らかになった。以上の結果から、当該発酵産物の土壌への施用によって、発酵産物由来の*Peanibacillus* sp.が植物の根圏微生物群と共生し、特に一部のProteobacteriaのポピュレーションを増加させ、結果として土壌の物質循環を制御し、植物体の生理機能を変化させうることが推察された。

Thermophile, plant, omics analysis

発表責任者：宮本浩邦（h-miyamoto@faculty.chiba-u.jp）

講演番号：2C19a07
講演日時：3 月 18 日 11:00～ C 校舎 19 会場

伝統的壺作り純米黒酢醸造における熟成期の菌叢解析
Studies on the diversity of microbial flora in traditional pot fermentation of rice vinegar
○渡辺 紳太[1]、堀 知行[2]、青柳 智[2]、橋口 和典[3]、長野 正信[3]、藤井 暁[3]、新井 博之[1]、石井 正治[1] ([1]東大院農生科、[2]産総研・環境管理、[3]坂元醸造株式会社)
○Shinta WATANABE[1], Tomoyuki HORI[2], Tomo AOYAGI[2], Kazunori HASIGUCHI[3], Masanobu NAGANO[3], Akira FUJII[3], Hiroyuki ARAI[1], Masaharu ISHII[1] ([1]Tokyo Univ., [2]AIST EMTech, [3]Sakamoto brewery)

【目的】蒸し米と麹と地下水のみを材料とし、壺内での微生物の代謝によってのみ発酵が進行する壺造り純米黒酢（坂元醸造）において、発酵中の菌叢の変遷について知見を深めることは大変興味深い。黒酢醸造においては、熟成のために「壺寄せ」を行う。即ち、~~3~~4 つの壺内の発酵液を ~~2~~3 つにまとめ、屋外に静置をしている。この黒酢醸造後期の熟成課程における菌叢の変化に関する知見はほとんどない。熟成期における菌叢の変化と微量成分の生成を関連づけることで、壺造り純米黒酢に特有の微量成分を生成する微生物の解明につながる可能性もある。そこで本研究では、熟成期の微生物の変遷を明らかにすることを目的として、次世代シークエンサーによる菌叢解析を行った。
【方法】熟成期における熟成期間の異なる（壺寄せ直後から壺寄せ後およそ 300 日）13×3 連のサンプルに対し、16S rRNA 遺伝子に基づく次世代シークエンサーを用いた解析を行った。
【結果と考察】門レベルでの菌叢比較解析および β 多様性を用いた多様性解析の結果から、熟成期において、熟成日数の経過とリンクして菌叢変化が起きており、特に熟成日数 150 日から 300 日にかけて大きな菌叢変化が起きていることが示された。また、属レベルおよび種レベルでの菌叢解析の結果から、熟成期において最も大きな比率を占めるのは *Lactobacillus* 属であり、その中でも特に *Lactobacillus acetotolerance* が最も優占的に存在していることが示された。一方で、菌叢全体における *L. acetotolerance* の存在比は熟成日数の経過とともに低下し、それに呼応するように *Acetobacter pasteurianus* や *Komagataeibacter xylinus* といった酢酸菌の存在比率が上昇していることが示唆された。現在、大きな菌叢変化が認められた熟成日数 150 日から 300 日にかけての時期の更なる菌叢解析や、酢酸や乳酸といった各種成分変化の解析を行っている。

traditional rice vinegar fermentation, microbial flora, next-generation sequencer

講演番号：2C19a08
講演日時：3 月 18 日 11:15～ C 校舎 19 会場

# DNA バーコードを用いた緑膿菌のポピュレーション解析

# Population analysis of Pseudomonas aeruginosa mutants using DNA barcode

○木戸 玲子、新井 博之、石井 正治（東大院・農生科）
○Reiko KIDO, Hiroyuki ARAI, Masaharu ISHII (The Univ. of Tokyo)

【目的】緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）は土壌、海水、淡水、動植物体内などに幅広く生息しているグラム陰性細菌であり、日和見感染を引き起こす病原菌として知られている。緑膿菌は好気呼吸を行う際に利用する末端酸化酵素や NADH デヒドロゲナーゼなど、エネルギー代謝関連の酵素を複数種持っており、生育環境に応じて、最も適した性質をもつ酵素を使い分けることで環境に適応していると考えられている。これまで、緑膿菌の遺伝子の役割に関する研究は、各々の破壊株の表現型解析などにより行われてきたが、破壊株や野生株を共培養したときに、どの株が優占化するかを定量的に解析した研究例はは少ない。しかし、より自然界に近い環境での各遺伝子の働きを見るためには、野生株や遺伝子破壊株を共培養してその生育を定量的に見る必要があると考えられる。そこで、本研究では、特定の塩基配列をもった断片を作製し、緑膿菌の各種破壊株のゲノムに組み込んでその塩基配列をバーコード（目印）とし、qPCR や次世代シークエンサーなどを用いて各破壊株を共培養したときにどの株が優占化するかを調べることができるシステムを構築し、それを用いてどの遺伝子が優占化に必要かどうかを定量的に見ることを目的とした。
【方法・結果】DNA バーコードでラベルした緑膿菌各種株を作製するため、20 塩基のランダム配列をもつようにプライマーを設計し、それぞれ異なる配列をもつ断片を獲得した。以後、これを DNA バーコードと呼ぶ。DNA バーコードをトランスポゾン Tn7 を用いて緑膿菌 PAO1 の野生株や末端酸化酵素破壊株のゲノムの特定の部位に組み込み、バーコードラベル株を作製した。各々の株を利用して共培養した培養液から DNA を抽出し、qPCR で各株の存在割合を算出し、このシステムの有効性を確認した。

Pseudomonas aeruginosa, population analysis, DNA barcode

講演番号：2C19a09
講演日時：3 月 18 日 11:30～ C 校舎 19 会場

好気呼吸機能関連遺伝子が微生物のコロニー形成に及ぼす影響
Influence of genes related to aerobic respiration on microbial colony formation
○伊藤 俊輔[1]、佐藤 伸吾[1]、林 真由美[1]、野村 一樹[1]、山口 利男[2]、井口 晃徳[1]、重松 亨[1]([1]新潟薬科大学・応用生命科学部、[2]新潟薬科大学・薬学部)
○Syunsuke ITO[1], Shingo SATO[1], Mayumi HAYASHI[1], Kazuki NOMURA[1], Toshio YAMAGUCHI[2], Akinori IGUCHI[1], Toru SHIGEMATSU[1] ([1]Fac. Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [2]Fac. Pharm., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci.)

【目的】 Koch の提唱した固体培養法により微生物の純粋培養法が確立したとされるが、自然界には固体培地上でコロニー形成の困難な種あるいは状態 (Viable but nonculturable; VNC) の微生物も多数存在する。また、一部の病原性微生物において VNC 化することも報告されており、人々に甚大な被害を出す恐れもある。微生物の VNC 化の要因として、培地に含まれる特定の成分や、遺伝子欠損によって生じる脂肪酸供給不全がコロニー形成に影響すると報告されている。本研究では微生物の好気呼吸機能に着目し、大腸菌をモデル微生物として呼吸阻害剤（$NaN_3$）の有無、ならびに電子伝達系遺伝子欠損株のコロニー形成能に及ぼす影響を解析した。
【方法】 親株 *Escherichia coli* BW25113 および電子伝達系の複合体Ⅰ～Ⅳのサブユニットをコードする各遺伝子を 1 つずつ欠損させた変異株［JW2271 株：NADH キノン酸化還元サブユニット N（複合体Ⅰ）の *ΔnuoN*、JW0712 株：コハク酸脱水素酵素疎水性膜アンカーサブユニット（複合体Ⅱ）の *ΔsdhD*、JW0723 株：シトクロム *bd* Ⅰユビキノール酸化酵素サブユニットⅡ（複合体Ⅳ）の *ΔcydB*、JW0421 株：シトクロム *bo*（3）Ⅱユビキノール酸化酵素サブユニットⅠ（複合体Ⅳ）の *ΔcyoB*］の液体および固体培養は LB 培地を使用した。生菌数の測定は Agar Noble（Difco、以降 AN）を終濃度 0.5%で添加した LB 固体培地によるコロニーカウント法（$N_C$）、および 96 well microplate を用いた液体培養に基づく最確数法（$N_L$）によりそれぞれ算出した。ここで $N_C/N_L$ をコロニー形成率とし、コロニー形成能の評価指標とした。また、親株 BW25113 に対して液体培養での増殖に影響しない $NaN_3$ 濃度を検討し、$NaN_3$ によるコロニー形成能の影響を解析した。
【結果・考察】 *ΔcydB* 欠損変異株（JW0723）の対数増殖期細胞における $N_C/N_L$ は 42.0%となった。一方親株 BW25113（対数増殖期）の $N_C/N_L$ は 89.2%となり、変異株は親株の半分のコロニー形成率を示した。また、親株 BW25113（対数増殖期）において液体培養での増殖を阻害しない $NaN_3$（終濃度 600 μM）を添加して調製した LB 固体培地を用いて $N_C/N_L$ を求めた結果、15.2%となった。$NaN_3$ 未添加系の $N_C/N_L$（89.2%）と比較して $NaN_3$ を添加した系は明らかに低いコロニー形成率を示した。以上の結果から、好気呼吸機能関連遺伝子の欠損によるコロニー形成の阻害、および $NaN_3$ 添加に伴う好気呼吸能の低下がコロニー形成に影響することが示唆された。現在、JW0723 株以外の複合体Ⅰ～Ⅳのサブユニットをコードする各遺伝子を 1 つずつ欠損させた変異株についてコロニー形成率を解析し、呼吸機能関連遺伝子とコロニー形成能の関連性を明らかにしている。

*E. coli*, aerobic respiratory function, colony forming ability

発表責任者：重松 亨（shige@nupals.ac.jp）

講演番号：2C19p01
講演日時：3 月 18 日 14:00～ C 校舎 19 会場

# 日本酒に含まれるバクテリア DNA
# Bacterial DNA included in Sake

○寺嵜 桃香、高橋 裕里香、西田 洋巳（富山県大）
○Momoka Terasaki, Yurika Takahashi, Hiromi Nishida (Toyama Pref. Univ.)

【背景・目的】

日本酒は酒米を麹菌が糖化し、その糖を清酒酵母がアルコール発酵してつくられる。よって、日本酒の中には、酒米、麹菌、清酒酵母の DNA が含まれている。また、酒造りはオープンな環境で行われており、原料や酒蔵に存在しているバクテリアが混入している。ただ、バクテリアの増殖は腐敗であり、その増殖は制限されている。本研究では、日本酒に含まれるバクテリア DNA の量、および網羅的 DNA シークエンス解析に基づくバクテリア菌叢を明らかにすることを目的とした。

【方法】

本実験では 8 社、11 種の日本酒を用いた。Amicon-Ultra-15 10K (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) を用いて 90 mL から 750 µL に濃縮したサンプル 0（開封後、冷蔵庫で 1 年以上保存）、30 mL から 350 µL～700 µL に濃縮したサンプル 1～10（開封直後にサンプリング）を NucleoSpin gDNA (Malcherey-Nagel, Duren, Germany)で精製した。サンプル 0 については、サンプリング後さらに酒瓶内で 4°C、約 200 日間保存し、同様に 30 mL から 450 µL まで濃縮し、精製を行い、サンプル 0+とした。

バクテリア 16S rRNA 遺伝子を特異的に増幅するプライマーセット(Corless et al., 2000)を用い、濃縮・精製した DNA サンプル 2 µL を使用して定量 PCR を行った。サンプル 0～4 のバクテリアに対しては、大量並列型 DNA シーケンサーMiSeq によって、16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列を決定し、バクテリア菌叢解析を行った。

【結果】

バクテリアの Cq 値は開封直後のサンプル 1～9 は 26 から 27 の範囲に収まっていたが、サンプル 0 では 21、サンプル 0+では 20 であった。よって、開封後一年の DNA 濃度は開封直後よりも約 32($2^5$) 倍高く、現在でもバクテリアが増殖している可能性を示した。日本酒に含まれるバクテリア DNA 量はほぼ一定であるにもかかわらず、バクテリア菌叢解析ではサンプル間で極めて異なっていた。サンプル 0 のみで *Lactobacillus* が見られた（菌叢の約 55%）。日本酒の腐敗として知られる「火落ち」の原因バクテリアが *Lactobacillus* 属菌種であることより、サンプル 0 は開封後に火落ち菌が混入、増殖したと考えられる。われわれは日本の伝統文化である日本酒において、DNA 解析を導入し、この伝統を維持、継承することにつなげたい。

Bacterial DNA, Sake (Japanese rice wine), *Lactobacillus*

講演番号：2C19p02
講演日時：3 月 18 日 14:15～ C 校舎 19 会場

# ヒト腸内細菌のオリゴ糖代謝能と代謝産物

# Impacts of oligosaccharides on growth and metabolic properties in gut anaerobes

○小瀬 理市[1]、栃尾 巧[2]、蓑田 香奈子[2]、平野 勝紹[2]、中川 純一[1]、遠藤 明仁[1]([1]東農大生物産業、[2]物産フードサイエンス研究開発センター)
○ Riichi OSE[1], Takumi TOCHIO[2], Kanako MINODA[2], Katsuaki HIRANO[2], Junichi NAKAGAWA[1], Akihito ENDO[1] ([1]Faculty of Bioindustry, Tokyo University of Agriculture, [2]B Food Science Co., Ltd.)

【背景・目的】

ヒトの腸内には多種多様な細菌が生息しており、我々の健康と密接に関係している。それら腸内細菌のバランスを維持及び改善するための方法の一つとしてプレバイオティクスが挙げられ、その代表例がオリゴ糖であり、現在までに様々なオリゴ糖が開発されている。一方で、オリゴ糖間での腸内細菌活性の違いについてはあまり知られていない。そこで本研究では *in vitro* にてオリゴ糖が腸内細菌の生育及び代謝活性に与える影響を比較することで、プレバイオティクスが腸内細菌叢に与える影響について考察することを目的とした。

【方法・結果・考察】

実験にはヒト腸内に優勢に生息する腸内細菌 21 種、29 菌株を用い、オリゴ糖は 1-ケストース、ニストース、フラクトオリゴ糖混合物 (FOSs)、キシロオリゴ糖混合物 (XOSs)、ラフィノース、ラクトスクロースの 6 つを用いた。またそれぞれのオリゴ糖に 0.5 %含有する培地で腸内細菌を培養後、生育度測定、消費オリゴ糖量、代謝産物測定を行った。

*Bifidobacterium* 属細菌はケストースを中心とする 3 糖で高い増殖能が見られた。この結果は FOSs を用いて培養した際はより顕著であり、15 菌株中 14 菌株がケストースを 70 %以上資化していたが、4 糖以上の糖を資化している菌株は 2 菌株であった。*Bacteroides-Parabacteroides* group の多くの菌株では、*Bifidobacterium* 属細菌よりも多くの菌株で 4 糖以上のオリゴ糖を代謝している事が確認され、多糖分解能に優れていることが示唆された。また潜在的善玉菌として考えられている *Akkermansia muciniphila* はいずれのオリゴ糖でも顕著な増殖は見られなかった。短鎖脂肪酸及び乳酸生産量を測定した所、生育と相関関係にあり 3 糖において他のオリゴ糖と比べ高い生産量であった。一方で、腐敗産物を測定した所、生育量との相関関係は菌株毎に異なり、*Bacteroides fragilis* のように生育量とインドールの生産量は正の相関関係にあるものと、*A. muciniphila* のように生育とインドールの生産量は負の相関が見られる 2 群に分かれ、糖ごとに生産量が異なっていた。これまでのヒト介入試験の結果、オリゴ糖混合物を摂取すると *Bifidobacterium* 属細菌と *Bacteroides-Parabacteroides* group が増殖することが報告されている。これは *Bifidobacterium* 属細菌が 3 糖のオリゴ糖を、*Bacteroides-Parabacteroides* group が 4 糖以上のオリゴ糖を資化し増殖しているのではないかと考えられる。

gut anaerobes, prebiotics, end products

発表責任者：遠藤　明仁（a3endou@bioindustry.nodai.ac.jp）

講演番号：2C19p03
講演日時：3 月 18 日 14:30～ C 校舎 19 会場

# 生きた麹菌の摂取が腸内環境に与える影響

# Effect of intake of "living Koji spores" on the intestinal environment

○山田 和広[1]、都築 翔[1]、高田 真由香[1]、村田 俊輔[1]、丸井 萌子[1]、長澤 麻央[1]、林 利哉[1]、片山 琢也[2]、丸山 潤一[2]、兒島 孝明[3]、中野 秀雄[3]、志水 元亨[1]、加藤 雅士[1]([1]名城大 農、[2]東大院 農生科 応生工、[3]名大院 生命工 生命技術)

○Kazuhiro Yamada[1], Syoh Tsutduki[1], Mayuka Takada[1], Shunsuke Murata[1], Moeko Marui[1], Mao Nagasawa[1], Toshiya Hayashi[1], Takuya Katayama[2], Jun-ichi Maruyama[2], Takaaki Kojima[3], Hideo Nakano[3], Motoyuki Shimizu[1], Masashi Kato[1] ([1]Meijo Univ., [2]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [3]Graduate School of Bioagricultural)

【背景と目的】 我が国では古くから、味噌、醤油、清酒などを醸造し豊かな食文化を形成してきた。発酵食品に含まれている様々な成分が我々の健康に寄与していることが多数報告されている。加熱工程を省いた生タイプの発酵食品の中には、麹菌や酵母が生きたままで存在しているものがあり、それらを食すことで我々は麹菌や酵母を生きたままで摂取していることが考えられる。

糸状菌は動植物の体内といった比較的低酸素環境にも棲息し、病徴を引き起こすこと、麹菌 *Aspergillus oryzae* および麹菌と近縁の *Aspergillus nidulans* は低酸素条件下（$O_2$ 濃度が 0.5 % 以下）でも生存し、アミノ酸や有機酸を発酵生産することが明らかとなっている (Shimizu M, *et al. Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2016, Shimizu M, *et al. Mol. Cell Biol.* 2012, Terabayashi Y, *et al. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012)。しかしながら、麹菌が腸内まで生きたままで届くのか、酸素濃度の低い腸内で活動しているのか、麹菌が生産した代謝物や酵素が我々や腸内細菌叢にどのような影響を与えているかは未知である。本研究では、麹菌の胞子をマウスに経口投与することでマウスの腸内環境にどのような影響を及ぼすのか検討した。

【結果および考察】 まず、麹菌胞子の胃酸耐性を検討した。pH 1.0, 2.0, 3.0 に調整した人工胃液に麹菌の胞子を 3 時間暴露したところ、どの pH においても生存率が 50%程度であったことから、麹菌胞子は胃酸に対して高い耐性を有していることが明らかになった。また、生きた麹菌の胞子 ($5.0\times10^3$) を 7 週齢の ICR マウス (♂) に経口投与し、得られたマウスの糞便を YPS 培地に接種したところ、麹菌のコロニーが多数検出された。これらのことから、麹菌、少なくとも麹菌胞子は生きて腸内まで届き生存できることが示唆された。次に、麹菌胞子 ($5.0\times10^2$、$5.0\times10^3$、$5.0\times10^4$) を摂取したマウス糞便中の代謝物を GC-MS を用いて解析した。コントロールには生理食塩水を与えたものを用いた。代謝物を解析したところ、麹菌を与えることによって、アラニン、バリン、プロリン、スレオニン、およびコハク酸の等の量が増加していた。一方、いくつかの糖やグリセロールは減少していた。さらに、生きた麹菌胞子の摂取がマウスの腸内細菌叢に影響を与えるかを qRT-PCR にて解析したところ、*Bifidobacterium longum* など常在のビフィズス菌が増加した。

以上の結果より、麹菌胞子を摂取したマウスの腸内で麹菌が活動し、宿主の腸内環境および腸内細菌叢に影響を及ぼしていることが示唆された。本研究は「腸内糸状菌」の存在とそれらの役割の可能性を示す最初の例であると考えている。

*Aspergillus oryzae*, Intestinal fungus, Intestinal bacteria

講演番号：2C19p04
講演日時：3 月 18 日 14:45～ C 校舎 19 会場

*Bifidobacterium animalis* における酸素感受性株の分離とその性状の解析
Isolation and characterization of the oxygen-sensitive mutants from *Bifidobacterium animalis*
○山本 裕司、田中 日向子、長坂 早希子、向井 孝夫（北里大獣医）
○Yuji YAMAMOTO, Hinako TANAKA, Sakiko NAGASAKA, Takao MUKAI (Kitasato Univ.)

*Bifidobacterium animalis* は、動物の消化管に棲息するビフィズス菌の中で酸素に耐性を示す数少ない菌種であり、そのストレス耐性の高さから生菌が必要とされるプロバイオティクスで広く利用されている。しかしながら、その高い有用性にも関わらずストレス耐性機構に関する知見は非常に限られている。本研究では *B. animalis* より酸素感受性株を分離し、その性状を解析することで、本菌が持つ酸素耐性メカニズムの解明を試みた。

はじめに本研究で用いた *B. animalis* subsp. *lactis* JCM10602 株の酸素耐性能を評価した。*B. animalis* JCM 10602 株、*B. longum* subsp. *longum* JCM 1217 株、*B. bifidum* JCM 1255 株, *B. breve* ATCC 15700 株を嫌気条件下、微好気条件下（大気下で静置培養）、好気条件下（大気下で振盪培養）で培養した結果、嫌気条件・微好気条件下よりは劣るものの、*B. animalis* でのみ好気条件下での増殖が確認された。また、各株を大気下で３週間低温保存したところ、*B. animalis* 以外のビフィズス菌では大きく生菌数が低下したが、*B. animalis* は保存開始時の約 5%程度の生菌数を維持していた。

続いて酸素感受性株の分離を行った。酸素感受性株の分離には変異剤である 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine（以下 NTG）を用いた。NTG で処理した *B. animalis* のコロニーを約 3,800 個分離し、96 穴プレートを用いて嫌気、微好気、および好気条件下で培養した。嫌気条件に比べ、好気あるいは微好気条件での増殖度が低下した株を分離し、再度試験管でその増殖能を評価した結果、好気条件下あるいは好気および微好気条件で増殖能が低下した株を 6 株取得することができた。また、96 穴プレートで培養した菌液を 10℃で保存することで、低温生残性が低下した株の分離を試み、これまでのところ 2 株の分離に成功した。

現在、分離された酸素感受性株において、酸素ストレスへの関与が推定される遺伝子の発現量を解析しており、その結果についても報告する予定である。

oxygen, bifidobacterium, probiotics

発表責任者：山本　裕司（yyamamot@vmas.kitasato-u.ac.jp）

講演番号：2C19p05
講演日時：3 月 18 日 15:00～ C 校舎 19 会場

*Bacillus subtilis* 168 株芽胞の発芽レセプター欠損株に対する香辛料精油成分の発芽阻害作用
Inhibitory effect of essential oil components derived from spice on the spores of germination receptor mutants of *Bacillus subtilis* 168

○阪井 俊夫[1]、坂元 仁[2,3]、土戸 哲明[2]、古田 雅一[1,2]（[1]大阪府大院工、[2]大阪府大 21 科研、[3]大阪府大 放研セ）
○Toshio SAKAI[1], Jin SAKAMOTO[2,3], Tetsuaki TSUCHIDO[2], Masakazu FURUTA[1,2] ([1]Dept. Quantum, Grad. Sch. Eng. Osaka Pref. Univ., [2]21Res. Osaka Pref. Univ., [3]Rad. Cres. Osaka Pref.Univ.)

【目的】芽胞形成菌は殺菌処理に抵抗性であり、殺菌処理後も生残した場合食品を汚染する。芽胞内膜に存在する発芽レセプターと環境中の発芽誘発剤が結合することで芽胞は発育を開始し、初期の発芽過程は芽胞懸濁液の濁度変化をモニターすることで追跡できる。演者らは濁度低下から発芽速度を求め、芽胞の制御を目的に香辛料の精油成分の抗菌性が *Bacillus subtilis* ATCC6633 株芽胞の発育過程のどの部分に作用するかを調べた[1)]。その結果、Carvacrol と Thymol は *B. subtilis* ATCC6633 株芽胞の発芽過程を阻害し、それぞれの作用濃度の閾値が異なることがわかった。本研究では両者の発芽阻害部位を明らかにするため、発芽レセプター（GerA, GerB, GerK）欠損株と、その親株である *B. subtilis* 168 を用い、香辛料精油成分の濃度と発芽阻害効果を検討した。
【方法】*B. subtilis* 168 *trpC2*の野生株、発芽レセプター二重欠損株（*Δ gerB gerK*, *Δ gerA gerK*, *Δ gerA gerB*）を用いSchaeffer培地上で芽胞を形成させた。また、GerAを対象とする発芽用溶液（以下発芽液）には1 mM L-alanineを含む50 mM リン酸カリウム緩衝液（以下KPB、pH 7.0）を、GerBおよびGerKを対象とする発芽液にはAGFK（L-asparagine, D-glucose, D-fructose, KCl）を含むKPBを使用した。DMSOに溶解させたCarvacrol, Thymolと発芽液を試験管中で混合して、70℃（L-alanine発芽液を用いる実験）もしくは80℃(AGFK発芽液を用いる実験)で事前に加熱活性化させた*B. subtilis*の芽胞を測定開始直前に添加した（各精油成分の濃度：0.0125～0.200 mg/ml、芽胞添加後の濁度:$OD_{600}$ ≒0.4)。試験管を37℃で振盪培養し、OD-monitor（ODBox-C, TAITEC）により$OD_{600}$で経時的に濁度を測定した。そして濁度の対数プロットの初期低下部分を直線近似し、その傾きから発芽速度定数を求めた。
【結果・考察】発芽速度の解析の結果、Carvacrol, Thymolのいずれも濃度の増加に応じてGerAもしくはGerK依存の発芽への阻害効果が高まったが、GerB依存の発芽は阻害しなかった。特にAGFK中で発芽させた場合、GerKに対するThymolの阻害開始濃度がCarvacrolよりも明確に低下した。従って、GerKに対する構造異性体の関係であるCarvacrolとThymolとの間で作用機構が異なることが示された。*B. subtilis*芽胞に対して加熱またはガンマ線で処理し、精油成分と共存させた場合の併用発芽阻害効果について現在調査中である。
【参考】1) 阪井ら 日本農芸化学会 2016 年度大会要旨集, 講演番号 3F032

*Bacillus subtilis* spore, germination, essential oil

発表責任者：阪井 俊夫（sr304010@gmail.com）

講演番号：2C19p06
講演日時：3 月 18 日 15:25～ C 校舎 19 会場

# 大腸菌の放射線処理における損傷細胞の評価

# Evaluation of the injured cell of Escherichia coli after gamma ray irradiation

○岩田 吏世[1]、西谷 巧太[1]、坂元 仁[2,3]、土戸 哲明[2,3]、古田 雅一[1,2,3]（[1]大阪府大院工、[2]大阪府大 21 科研、[3]大阪府大放研セ）

○Riyo Iwata[1], kouta Nishitani[1], Jin Sakamoto[2,3], Tetsuaki Tsuchido[2,3], Masakazu Furuta[1,2,3] ([1]Dept. Quantum, Grad. Sch. Eng., Osaka Pref. Univ., [2]21Res. Osaka Pref. Univ., [3]Rad. CRes. Osaka Pref. Univ.)

[目的] 微生物の存在は腐敗や劣化の原因となることから、その制御のために加熱や薬剤など様々なストレス処理が用いられている。放射線処理は低温状態のまま処理が可能であることから、とくに医療用品や容器に応用されており、諸外国では食品殺菌の分野でも活用されている。食品においては品質劣化を考慮した比較的穏やかな加熱処理がしばしば適用されるが、処理直後には生死が定まっておらず、その後の環境条件によっては損傷を修復し増殖可能となるいわゆる損傷菌が発生する。この損傷菌評価に関して、近年蛍光染色を用いた迅速な評価法も利用されている。当研究室ではこの損傷菌の評価方法として、「固液培地生存性差分法」（Difference in Viabilities between Solid and Liquid Media－DiVSaL－法）を提唱し、実例として大腸菌の加熱損傷における損傷菌評価に適用した [1)]。この方法は、平板法と発育遅延解析法を用いる点から、固体と液体それぞれの培地において菌体内で異なる二次的損傷(活性酸素など)が発生しないことが前提条件になる。しかし、固形培地である寒天培地の場合は液固シフトの損傷 [2)]が発生する可能性に対して、抗酸化剤の添加効果が認められた [3)]。今回は、加熱処理とは異なる、主な損傷部位として DNA 鎖が想定される放射線処理を施し、損傷細胞評価を検討した。

[方法と結果]大腸菌 K12 W31110 のプロリン要求性の派生株 NBRC 106482(OW6)として用いた。0.1%カザミノ酸を含む M9（EM9）液体培地中、30℃で培養し、対数増殖期の細胞を集菌、洗浄後、50 mM リン酸カリウム緩衝液（pH7.0）中、コバルト 50 線源を利用しガンマ線照射をおこなった。また、平板上での損傷菌の修復強化のために過酸化水素消去剤の終濃度 0.1%(w/v)ピルビン酸ナトリウム（以下 NaP と略す）および抗酸化剤である終濃度 1.0%(w/v)チオ硫酸ナトリウム(以下 NaTS と略す)を寒天培地に添加し、それらの効果を検討した。その結果、加熱処理では抗酸化剤の添加効果が顕著に現れたのに対して、今回のガンマ線処理では、差がみられなかった。また、損傷細胞の割合も加熱処理に比べて死滅速度に対して、少なかった。一方、迅速法として利用されている蛍光染色法(CFDA,EthD3,CTC,DAPI)を用いても評価もおこなったが、ガンマ線照射線量(0～1.0 kGy)の増加に伴う損傷の増加はみられなかった。

[文献]1）岩田ら防菌防黴講演要旨集 2015,2）西谷ら、日本食品微生物学会学術総会講演要旨集 2014,3）岩田ら日本食品微生物学会学術総会講演要旨集 2016

injured cell, growth delay analysis, gamma ray irradiation

講演番号：2C19p07
講演日時：3 月 18 日 15:40～ C 校舎 19 会場

寒天培地上での大腸菌細胞における酸化ストレスの解析
Is *Escherishia coli* cells exposed to oxidative stress on agar medium?
○坂元 仁[1,2]、岩田 吏世[3]、古田 雅一[1,2,3]、土戸 哲明[1] ([1]大阪府大 21 科研、[2]大阪府大放研セ、[3]大阪府大院工)
○Jin Sakamoto[1,2], Riyo Iwata[3], Masakazu Furuta[1,2,3], Tetsuaki Tsuchido[1] ([1]21Res. Osaka Pref. Univ., [2]Rad. CRes. Osaka Pref. Univ., [3]Dept. Quantum, Grad. Sch. Eng., Osaka Pref. Univ.)

〔目的〕加熱損傷などの致死的ストレスに曝された大腸菌細胞において、生存率の評価に一般的に寒天培地を用いたコロニーカウント法が汎用される。この時、一方の寒天培地にピルビン酸ナトリウムの添加やカタラーゼを塗布すると、生存率の増大が検出され、加熱処理時には死滅せず、寒天培地上で死滅が決定されるいわゆる“損傷菌”の存在が示唆されている。寒天培地上での損傷菌の死滅に過酸化水素の関与が示唆される。しかしながら、寒天培地上で生育するコロニー上の細胞は液体培養の細胞よりも本当に酸化的な条件に曝されているのだろうか。これまでの我々の加熱損傷させた大腸菌の結果では、コロニーカウント法では過酸化水素スカベンジャーの添加による蘇生効果はあるが、液体培地を用いた生育遅延解析法での生存率の評価では、培地への抗酸化剤の添加では回復効果は認められなかった（岩田ら,日本食品微生物学会学術総会講演要旨集 2016)。つまり、酸化ストレスは固体培養で誘起されるに特有の現象であることが示唆されている。そこで固体培養と液体培養の大腸菌細胞で細胞質内の過酸化水素レベルから酸化状態の調査を試みた。
〔方法と結果〕大腸菌 K12 W3110 のプロリン要求性の派生株 NBRC 106482 を親株（通称 OW6）として用いた。細胞レベルでの酸化ストレスの指標として過酸化水素濃度の推定を試みた。Belousov(2006)らが報告した HyPer は円順列変異型黄色蛍光タンパク質 YFP に大腸菌の過酸化水素応答の転写調節因子 OxyR を 2 分割して連結した過酸化水素センサータンパク質である。この遺伝子の C 末端側に His-tag を連結した L-アラビノース誘導で発現する発現ベクターpBAD1921-HyPer-His を構築した。しかし、YFP は一般にプロトンやハライドイオンなど環境因子に対しても高い感受性を示す問題点がある。そこで OxyR の過酸化水素処理での活性化に関与するジスルフィド結合の形成に関与する 199 番目の Cys 残基に相当する HyPer の Cys 残基を Ser 残基に置換した pBAD-1921-HyPer(C199S)-His を構築した。HyPer は還元状態では励起光 405nm 付近で最大蛍光を示すが、酸化状態では励起光 488nm 付近で最大蛍光を示す。HyPer の 2 励起 1 測光でのレシオ値により、酸化還元状態に依存した励起シフトから細胞内過酸化水素濃度を推定し、酸化しても励起シフトを起こさない HyPer(C199S)のレシオ値との比から他の環境因子による影響をキャンセルし、酸化の影響のみを検出できる実験系とした。
Ratio={Ex488nm[HyPer] /Ex405nm[HyPer]}/{Ex488nm[HyPer(C199S)]/Ex405nm[HyPer(C199S)]}
このシステムを用いた液体培養細胞と固体培養細胞の酸化レベルの比較結果について報告する。
Belousov et al. Nat Methods. 3:281-286 (2006) .

oxidative stress, solid culture, injured microbes

発表責任者：坂元　仁（Sakamoto.Jin@cs.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：2C19p08
講演日時：3 月 18 日 15:55～ C 校舎 19 会場

# 低温飢餓に曝された大腸菌のコロニー形成の制御に関わる遺伝子の解析

# Analyses of genes affecting colony forming activities of Escherichia coli under cold starvation condition.

○西尾 優宏、浅井 健宏、小川 哲弘、日髙 真誠、正木 春彦 (東大院農生科・応工)
○Masahiro Nishio, Takehiro Asai, Tetsuhiro Ogawa, Makoto Hidaka, Haruhiko Masaki (Dept. of Biotech., The Univ. of Tokyo)

バクテリアは、純粋培養法によりコロニーとして分離されてきた。しかし、様々な培養条件・培養法が試みられてきたにも関わらず、環境中のバクテリアの大部分は未だ分離・培養が困難で、膨大な微生物資源が手付かずの状態にある。我々は、バクテリアにおけるコロニー形成を、「生きている」以上の特別な生物学的現象と捉えて、それを支配している共通の遺伝メカニズムがあると考え、それを明らかにして広範囲に適用可能な培養法を開発したいと考えている。

大腸菌のような培養の容易なバクテリアでも、低温飢餓などのストレスに曝すことで、生存反応は保ったまま栄養培地でのコロニー形成数が減少していく Viable But Non-Culturable (VBNC) 現象が知られており、環境中のコロニー形成できないバクテリアのモデル実験系と考えられている。大腸菌が VBNC 化していく過程に起こる代謝の変化及び、それを制御する遺伝子の働きを明らかとすることで、バクテリアに共通するコロニー形成能に関わる分子機構の発見を目指している。

我々は、低温飢餓により大腸菌のコロニー形成能がなくなるのは、コロニー形成にとって重要な遺伝子機能あるいは産物が減衰していくためだと想定して、そのような遺伝子をスクリーニングした。その過程で、想定に反して、遺伝子を欠失することにより低温飢餓に曝してもコロニー形成能が高く保たれる現象を発見した。この現象は、大腸菌がストレスに対応してコロニー形成を計画的に抑える機構が存在することを示唆すると考えている。

本発表では、欠失することにより低温飢餓条件下でも VBNC 化しにくくなる遺伝子として、システイン合成及び硫黄代謝のマスターレギュレーターをコードする *cysB* 遺伝子に着目した結果を報告する。*cysB* 以外に、システイン合成の鍵酵素である *cysE* 遺伝子の欠失株も部分的に *cysB* 欠失株と同様の表現型を示した。また、これらの株はシステインを添加した培地で培養することにより、VBNC 化しにくい表現型が失われた。加えて、もう一方の含硫アミノ酸であるメチオニン合成遺伝子を欠失した株ではシステイン要求株と異なり、VBNC 化しにくい表現型は示さなかった。これらのことから、細胞内のシステイン量が低温飢餓条件下でコロニー形成能を制御する鍵になっていると考えた。更に、細胞内のシステイン量が低温飢餓条件下の細胞にどのよう影響を与えることにより VBNC 化を抑制するかを検討した。

VBNC, cysteine

発表責任者：西尾　優宏（hont1321567@gmail.com）

講演番号：2C19p09
講演日時：3 月 18 日 16:10～ C 校舎 19 会場

# 大腸菌の長期生存に寄与する変異の解析

# Analysis of mutations contributing to long-term survival in *Escherichia coli*

○脇 義賢[1]、川口 純平[1]、増田 知美[1]、村田 正之[1]、高坂 智之[2]、山田 守[1,2]([1]山口大学・医、[2]山口大学・創科・山口大中温微生物セ)
○Yoshikata WAKI[1], Junpei KAWAGUCHI[1], Tomomi MASUDA[1], Masayuki MURATA[1], Tomoyuki KOSAKA[2], Mamoru YAMADA[1,2] ([1]Graduate School of Medicine, Yamaguchi Univ., [2]YU-RCTMR)

【目的】　細菌にとって栄養飢餓は極めて重要なストレスの 1 つである。グラム陰性菌である大腸菌は、遅滞期、対数増殖期、定常期、死滅期を経て、長期定常期に入ることが知られており、栄養が枯渇する長期定常期における飢餓状態への集団適応として、栄養環境に適した表現型をもつ株が入れ替わることで飢餓ストレスに対応する、生育優位性（GASP）が提唱されている。これまでに我々は、大腸菌の細胞集団が長期定常期において生菌数が増減を繰り返すことを観察し、この生菌数の変動の各頂点にある細胞集団は生存に有利な変異を獲得していると予測して、培養開始後 468 時間において生存できる細胞（K468）のゲノムを次世代シーケンサーにより解析したところ *ndk* と *spoT* への変異を確認した。これらの遺伝子はそれぞれ細胞内(p)ppGpp 量の調節に関わっていることから、細胞内(p)ppGpp 量の変化が GASP の獲得に関与することが予想された。本研究では、K468 の生育優位性を確認すると同時に、その生育優位性における 2 つの変異の役割を明らかにするために一遺伝子変異導入株を作製し、その表現型の解析を行った。
【結果】　競合アッセイにより親株に対する生育優位性を確認したところ、K468 は培養開始後 150 時間以降においても親株よりも高い生菌数を維持したことから、K468 は親株に対し生育優位性を示すことが分かった。また、表現型の観察結果より、K468 は親株よりも細胞濁度が低く、細胞長が短いことが明らかとなった。一般に、大腸菌において高濃度の(p)ppGpp により細胞長は短くなることが報告されていることから、K468 は親株に比べ細胞内(p)ppGpp 濃度が高いと推察した。次に、*spoT* と *ndk* への変異が細胞の生育に与える影響を解析するため、まず *spoT* の変異を親株に移した一遺伝子変異導入株（*spoT* mutant）を作製し、その表現型の観察を行った。その結果、*spoT* mutant では親株と比べ細胞長の伸長と生育速度の低下が観察された。(p)ppGpp の合成酵素を欠損した株において細胞長の伸長と生育速度の低下が報告されていることから、*spoT* の変異は細胞内(p)ppGpp 濃度の減少を引き起こしていることが示唆された。以上の結果から、K468 の表現型には *ndk* の変異が不可欠であり、*ndk* と *spoT* の両遺伝子の変異による細胞内(p)ppGpp 濃度の上昇が K468 の親株に対する生育優位性に寄与している可能性が示唆された。

Esherichia coli, GASP, (p)ppGpp

発表責任者：脇義賢（v031uh@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：2C19p10
講演日時：3 月 18 日 16:25～ C 校舎 19 会場

# 環境常在細菌に見出された新規低栄養環境適応機構に関する研究

# Novel mechanism in environmental bacteria for adaptation toward oligotrophic conditions

○稲葉 慎之介、加藤 広海、大坪 嘉行、津田 雅孝、永田 裕二（東北大・院生命科）
○SHINNOSUKE INABA, HIROMI KATO, YOSHIYUKI OHTSUBO, MASATAKA TSUDA, YUJI NAGATA (Tohoku Univ.)

【背景・目的】好気性従属栄養細菌で *Alphaproteobacteria* に属する *Sphingobium japonicum* UT26 株は、環境汚染物質である有機塩素系殺虫剤γ-hexachlorocyclohexane (γ-HCH) を唯一炭素源として生育できる。我々は、本株が Zn-dependent alcohol dehydrogenase (ADH) 遺伝子 (*adhX*) の高発現で有機炭素源非添加の無機固体培地で $CO_2$ 固定を伴ってコロニー形成する現象（oligotrophic 表現型）を見出した。さらに、(i) UT26 株の *adhX* は染色体上の Tn*3* 型トランスポゾンに囲まれた領域に存在し、UT26 類縁菌株に見出された *adhX* を含む当該領域はほぼ全てプラスミド上に局在すること、(ii) UT26 株の不均衡変異導入株（DNA 複製のエラーを校正する機能を欠如したポリメラーゼにより高い突然変異効率を示す株）では、高頻度で *adhX* 高発現による oligotrophic 突然変異株が取得されたこと、から、*adhX* 関与の oligotrophic 表現型は、環境常在細菌が有する普遍的な低栄養環境適応機構のひとつの可能性が高いと考えている。本研究では、本機構の普遍性と分子メカニズムの解明を目的に解析を進めた。
【方法・結果および考察】UT26 株由来 *adhX* 高発現プラスミドを他環境細菌株に導入したところ、*Alphaproteobacteria* のみならず、*Betaproteobacteria* に属する株でも oligotrophic 表現型が観察された。この結果は、*adhX* 関与の oligotrophic 表現型が環境常在細菌が有する普遍的な低栄養環境適応機構のひとつの可能性であることを支持する。一方、当該プラスミドの導入の有無に関わらず oligotrophic 表現型を示す *Alphaproteobacteria* 株および *Gammaproteobacteria* 株も存在した。これら株では、宿主株が本来有する *adhX* ホモログが機能している可能性が考えられたため、当該株の *adhX* ホモログの破壊株を構築し、現在、その可能性を検討している。一方、UT26 株において、*adhX* 遺伝子の上流には、アルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子 (*aldh*) が存在し、*adhX* との遺伝子セットは UT26 類縁株でも保存されていることから、*aldh* も oligotrophic 表現型に関与する可能性が考えられた。そこで、*aldh* の完全欠失株を構築し、本株の oligotrophic 表現型を検討したが、野生型株との違いは観察されず、*aldh* は当該表現型には必須ではないことが示された。すなわち、これまでの研究で AdhX の ADH 活性の強さと oligotrophic 表現型との間に相関関係は見出されているものの、本表現型に、特定のアルコール基質がアルデヒドを経て代謝される過程が関与している可能性は低いと考えられる。AdhX は *Pseudomonas putida* 株由来の formaldehyde dismutase (FDM)とも有意な相同性を示し、活性に必須なアミノ酸残基も保存されていることから､FDM 活性が本表現型に重要である可能性が考えられたため、現在、AdhX の FDM 活性を精製酵素を用いて検討している。

sphingomonads, oligotroph, carbon fixation

講演番号：2C19p11
講演日時：3 月 18 日 16:50～ C 校舎 19 会場

枯草菌における栄養状態に応じた新規 GTP 制御機構の解析
Analysis of A novel regulatory mechanism of GTP synthesis
○大坂 夏木[1]、高田 啓[2]、多喜乃 雄太[1]、兼崎 友[3]、渡辺 智[1]、千葉櫻 拓[1]、吉川 博文[1] ([1]東京農大・バイオ、[2]立教大学・理・生命理学、[3]東京農大・ ゲノ ム解 析セ)
○ NATSUKI OSAKA[1], HIRAKU TAKADA[2], YUTA TAKINO[1], YU KANESAKI[3], SATORU WATANABE[1], TAKU CHIBAZAKURA[1], HIROHUMI YOSHIKAWA[1] ([1]Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Rikkyo Univ., [3]Tokyo Univ. of Agriculture, Genome Research Center)

【背景・目的】ATP, GTP といったプリンヌクレオチドは細胞内における多くの生体反応に利用されており、その生合成は栄養状態において厳密に制御されている。枯草菌においては、警告物質である核酸小分子(p)ppGpp がアミノ酸飢餓に応じて合成・蓄積され、細胞内における ATP に対する GTP 量(GTP/ATP 量比)を低下させるといった劇的な制御が存在する。(p)ppGpp は GTP 生合成経路で働く酵素の活性を直接阻害することで GTP/ATP 量比を低下させ、その結果、転写開始点+1 の塩基が guanine である rRNA オペロン等の発現が抑制される一方、adenine であるアミノ酸生合成関連遺伝子等の発現が促進される。(p)ppGpp 合成酵素を全て欠失した株(ppGpp$^0$ 株)は、アミノ酸飢餓時に GTP/ATP 量比の制御ができないため、最少培地において生育阻害を示す。その生育阻害を抑圧する変異の探索を行った結果、(p)ppGpp によって直接阻害される *de novo* GTP 生合成経路の酵素遺伝子以外に、プリンヌクレオチド生合成経路の初発酵素遺伝子 *prs* の ORF 内に抑圧変異を同定した。このことから Prs を標的とした、 (p)ppGpp に依存せず、よりシンプルに栄養状態に適応する制御が存在するのではないかと考え、抑圧変異 *prs* のより詳細な解析を行ってきた。
【方法・結果】抑圧変異 *prs* を持つ株(*prs1*)において Prs のタンパク量を確認したところ、野生株と同等であり、この変異が質的に影響を与えるものであることが示唆された。このことは抑圧変異が Prs の立体構造において、活性中心の近傍や、多量体形成の架橋部位等に位置していたことから想定していた影響と一致しており、Prs の機能低下によってアミノ酸飢餓に対する適応性が回復していることが考えられた。次に、この適応性の回復と細胞内プリンヌクレオチド量との関連性を探るために、*prs1* における ATP・GTP 量を HPLC により解析したところ、*prs1* では、ATP・GTP 両者の絶対量の低下が見られた。これらの結果から、Prs の機能低下により、プリンヌクレオチド全体量を制限することで、アミノ酸飢餓に対して適応できることが示唆された。この適応メカニズムについて、より上流でシグナルとして働くものを明らかとするために、*prs1* をもつ ppGpp$^0$ 株の最少培地における生育の回復が見られなくなる条件の探索を行った。その結果、メチオニンを添加した最少培地において、生育阻害を示すことが分かった。以上のことから、プリンヌクレオチド生合成と細胞内におけるメチオニンの量には相関性があることが示唆された。これまでの結果を踏まえて、栄養状態に応じたプリンヌクレオチド生合成の制御機構には、(p)ppGpp を介した GTP/ATP 量比の制御がある一方で、メチオニンの量がシグナルとなるような Prs を標的とした制御が存在するのではないかと考えている。

*Bacillus subtilis*, GTP synthesis, stringent control

発表責任者：大坂夏木（44215010@nodai.ac.jp）

講演番号：2C19p12
講演日時：3 月 18 日 17:05～ C 校舎 19 会場

# カンピロバクターの株間における酸耐性能の比較

# Acid resistance among various Campylobacter strains

○稲田 慎也、江口 陽子 (近畿大学生物理工)
○Shinya INADA, Yoko EGUCHI (Kindai Univ.)

【目的】わが国におけるカンピロバクターによる食中毒事件の最近の発生状況は、細菌性食中毒では第 1 位の座を守り続けており、社会的に大きな問題となっている。カンピロバクターは、微好気性のグラム陰性らせん菌であり、酸化や飢餓などの環境ストレスを受けることで、らせん型から球型に変化する。カンピロバクターは、数百個程度の少数の菌数でヒトに腸炎を引き起こすことから、ヒトの胃の強酸条件を通過するために何らかの酸耐性メカニズムをもつと考えられている。胃の強酸条件下でのカンピロバクターの酸耐性メカニズムを解明すれば、同菌による食中毒予防につながることが期待される。そこで本研究では、*Campylobacter jejuni* を用い、酸耐性メカニズムの解析に用いるための酸耐性能の強い株と弱い株の分離を行った。
【方法】*C. jejuni* を固体培地上、42℃、10％$CO_2$下で 24 時間培養し、$OD_{600}$=0.2 になるように液体培地に懸濁した。この菌液を塩酸で pH を調整した液体培地に 10 分間曝した後、生菌数を測定して生残率を算出した。菌は標準株としての NCTC11168 株および市販の鶏肝から単離した *C. jejuni* 株を用いた。
【結果】NCTC11168 株について、酸処理条件を pH2.5、3.5、5.5 で検討したところ、pH2.5 では、菌は生残しなかったが、pH3.5 および 5.5 では、生残した。そこで、酸処理条件を pH3.5、10min とした。次に、NCTC11168 株について、らせん型とストレスを受けた球型のどちらが酸処理後の生残率が高いかを検討した。らせん型か球型かは、位相差顕微鏡を用いて確認した。酸耐性能を比較したところ、生残率はらせん型で 11%、球型で 4.6%であり、らせん型の方が、若干高い酸耐性能を示した。そこで、形態の違いによる結果のバラツキを防ぐために、酸耐性試験は、らせん型で行うこととした。さらに、鶏肝由来の分離株の中には運動性が高いために固体培地上で生菌数が測定できない株が存在した。そこで酸処理後の生菌数を、マイクロタイタープレートを用いた液体培養法で測定して生残率を算出する方法を構築した。液体培養法で測定した結果、pH3.5、10 分間の処理によって、NCTC11168 株は、約 1-10%生残したのに対し、鶏肝由来のカンピロバクターの中には、約 0.1-1%しか生残しないものも存在した。今後、当研究室で保管している鶏肝由来のカンピロバクター分離株コレクションに対して、酸耐性能の比較を行う。

Campylobacter, acid resistance, survival

講演番号：2C19p13
講演日時：3 月 18 日 17:20～ C 校舎 19 会場

土壌での放線菌の生理・生態解析を目指した *Streptomyces griseus* の滅菌土壌培養
Model soil cultivation systems for physiological analysis of *Streptomyces griseus* in soil
○河内 護之、手塚 武揚、妹尾 啓史、大西 康夫（東大院・農生科）
○Moriyuki KAWAUCHI, Takeaki TEZUKA, Keishi SENOO, Yasuo OHNISHI (Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., Univ. of Tokyo)

【背景・目的】
放線菌は、原核微生物でありながら複雑な形態分化能と多様な二次代謝物生産能を有しており、形態分化研究のモデル及び医薬資源として重要視されてきた。しかしながら、これまでの放線菌研究は、寒天培地を用いた固体培養又は、液体培養を用いて実施されてきた為、主要な単離源である土壌中での放線菌の生理・生態については、ほとんど知られていない。そこで、土壌中での放線菌の生理・生態の解明を目指し、これまで我々の研究室で形態分化や二次代謝の制御機構を解析してきた *Streptomyces griseus* を研究対象として、分子生物学的アプローチが可能な実験系の構築を試みた。
【方法・結果】
はじめに *S. griseus* の生育しやすい土壌を、(i) 東大生態調和農学機構圃場の黒ボク土、(ii) 東大千葉演習林の褐色森林土、(iii) 京大標茶演習林の褐色森林土、(iv) 新潟県農業総合研究所圃場の灰色低地土から選抜した。それぞれの土壌は、2 mm メッシュを通した細土をオートクレーブ滅菌して用いた(以下滅菌土壌とする)。2 g の滅菌土壌を 15 ml チューブに分注し、最大容水量の 50%になるよう胞子液を添加し 1 週間 28℃で培養した。培養後、実体顕微鏡を用いて観察した結果、土壌(iv)で特に旺盛な生育が見られた。そこでさらに走査型電子顕微鏡で詳細に観察した結果、胞子形成が確認され、実際に土壌団粒上で *S. griseus* が形態分化している様子が観察できた。
続いて、滅菌土壌培養での *S. griseus* の分子生物学的解析実施の為、核酸抽出法を検討した。まず DNA 抽出法について検討した結果、PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio 社) を用いることで抽出できた。続いて、RNA 抽出法について検討を行った。RNA 抽出にあたっては、農研機構生物機能利用研究部門藤井らの方法 [1]を参考に、カゼイン添加により土壌への RNA の吸着を低減する方法を適用した。その結果、RNA PowerSoil Total RNA Isolation Kit (MoBio 社)を使用することで、RNA の精製が可能となった。さらに、RNA PowerSoil DNA Elution Accessary Kit (MoBio 社) を用いることで、RNA と DNA の同時精製が可能となった。
今後、*S. griseus* の形態分化能を失った変異株も用いて、土壌培養での放線菌の生理・生態について、培養過程のトランスクリプトームの変化に着目し解析する予定である。

1) Wang Y. *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **96** (3), 793-802

*Streptomyces griseus*, autclaved soil, physiology

講演番号：2C19p14
講演日時：3 月 18 日 17:35～ C 校舎 19 会場

*Staphylococcus aureus* に対するパルミトレイン酸の抗菌活性メカニズムの検討
Mechanism of antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* by palmitoleic acid
○大西 耕平[1]、畑中 優佳[2]、藤川 真理子[2]、安井 夕貴[2]、倉田 淳志[1]、永尾 寿浩[3]、岸本 憲明[1] ([1]近大院農、[2]近大農、[3]大阪市立工業研究所)
○Kohei Ohnisi[1], Yuuka Hatanaka[2], Mariko Fujikawa[2], Yuuki Yasui[2], Atushi Kurata[1], Toshihiro Nagao[3], Noriaki Kishimoto[1] ([1]Grad. Sch. of Agric. Kindai. Univ., [2]Kindai Univ., [3]Osaka Municipal Technical Research Insititute)

【目的】　アトピー性皮膚炎（AD）は子供の 15～30%、大人の 5%が発症しているアレルギー疾患である。健常者の皮膚菌叢は多様性が高いのに対して、AD 炎症部では菌叢の多様性が低下し *Stapylococcus aureus* の割合が顕著に増加している。また AD モデルマウスを用いた実験では、皮膚常在菌である *S. aureus* が AD を発症させていることが明らかにされている。更に、皮膚常在菌の 1 つ *S. epidermidis* が *S. aureus* の増殖を抑制し、ヒトの皮脂に含まれるサピエン酸（6-*cis*-C16:1）が *S. aureus* の生育を阻害することから、*S. aureus* の増殖を選択的に阻害する抗菌脂肪酸の開発が期待されている。我々はパルミトレイン酸（9-*cis*-C16:1，POA）が弱酸性下で *S. aureus* の増殖を抑制することを報告してきた（1～3）。本研究では、POA による *S. aureus* の生育阻害機構を検討した。
【方法と結果】　POA は *S. epidermidis* よりも *S. aureus* に、また弱アルカリ性より弱酸性で高い抗菌活性を示した。*S. aureus* に対する POA の最小発育阻止濃度（MIC）は pH で変動し、pH 6.0 で MIC が最も小さく（7.8 ppm）、pH 7.0 で 4 倍、8.0 では 64 倍に上昇した。一方、*S. epidermidis* に対しては pH 7.0 で MIC が最も小さく（44.2 ppm）、pH 6.0 で 7 倍、8.0 では 11 倍に上昇した。また、37℃で 15 min 間 POA（62.5 ppm）に曝露させた両株を蛍光染色試薬 4',6-diamidino-2-phenylindole（DAPI）と Propidium Iodide（PI）または 5-cyano-2, 3-ditolyl tetrazolium chloride（CTC）で二重染色したところ、pH 6.0 と 7.0 で曝露した *S. aureus* は PI で染色され CTC では染色されなかった。一方、*S. epidermidis* はいずれの pH でも PI で染色されず、CTC で染色された。さらに 37℃で 30 min 間 POA に曝露した *S. aureus* 懸濁液上清からは SDS-PAGE で 10 と 8 kDa にバンドが検出された。そして、上清の K+ 濃度は経時的に増加し、生菌数は減少した。これらの結果から、POA に曝露された *S. aureus* では細胞膜が損傷を受け、低分子量のタンパク質や K+が漏出して PI で染色されたと考えた。また、POA に曝露した菌は CTC で染色されず、生菌数が減少していたことと、$DiSC_3(5)$を用いて POA に曝露した *S.aureus* の膜電位を測定したところ、蛍光強度が上昇し膜電位が喪失されていたことから、POA は殺菌的に作用していると考えた。*S. aureus* と *S. epidermidis* の細胞表層の疎水性を microbial adhesion to hydrocarbon 法で測定したところ、*S. epidermidis* の細胞表層は *S. aureus* よりも親水性が高いことを見出した。現在、両株の細胞壁成分を調べている。
1～3：　永尾寿浩ら、日本農芸化学会 2013, 2014, 2016 年度大会

anitibacterial acitivity, palmitoleic acid, *Staphylococcus aureus*

発表責任者：岸本憲明（kisimoto@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：2C19p15
講演日時：3 月 18 日 17:50～ C 校舎 19 会場

皮膚菌叢の健全化を目指した *Stapylococcus aureus* と *S. epidermidis* の共培養によるパルミトレイン酸の選択的抗菌活性の評価

Evaluation of selective antibacterial activity of palmitoleic acid with co-cultivation of Stapylococcus aureus and S. epidermidis.

○永尾 寿浩[1]、田中 重光[1]、倉田 淳志[2]、岸本 憲明[2]（[1]阪市工研、[2]近畿大院農）

○ Toshihiro Nagao[1], Shigemitsu Tanaka[1], Atsushi Kurata[2], Noriaki Kishimoto[2] ([1]Osaka Municipal Technical Research Institute, [2]Grad. Sch. of Agric. Kindai Univ)

【背景・目的】

皮膚バリア機能破綻を引金とする Th2 細胞性炎症であるアトピー性皮膚炎（Atopic dermatitis, AD）は様々な要因で発症・増悪化するが、それらの要因の 1 つが、皮膚菌叢の多様性と、*Staphylococcus aureus* と *S. epidermidis* の関係である。健常者では皮膚菌叢の多様性が高く、*S. aureus* よりも *S. epidermidis* の方が優勢である。一方、AD の炎症部では皮膚菌叢の多様性が低下して *S. aureus* が顕著に増加し、この菌の分泌物が AD の増悪化に関与する。そこで、*S. aureus* を抑制し *S. epidermidis* を抑制しない選択的抗菌活性により皮膚菌叢を健全化し、AD などの皮膚疾患の増悪化を予防する素材が期待されている。

これまでの我々の研究では、皮膚に存在するが、天然油脂に存在しないサピエン酸（6-*cis*-C16:1, SA）の異性体で、一部の植物油に存在するパルミトレイン酸（9-*cis*-C16:1, POA）は、SA と同じ活性があり、弱酸性下で *S. aureus* に対して抗菌活性が強く、*S. epidermidis* に対して活性が弱い選択的抗菌活性を示した。しかし、従来までの抗菌活性の評価法は液体培地を用いた手法であり、皮膚に塗布するクリーム等を評価するためには、現状と乖離している。そこで、皮膚での in vivo 実験の前段階として、寒天培地を用いた *S. aureus* と *S. epidermidis* の共培養実験を行った。

【方法・結果】

種々の pH に調整した NB 寒天培地に、*S. aureus* NBRC13276 と *S. epidermidis* NBRC100911 が各々 3,000 cfu/cm$^2$ となるように混ぜて塗布した。次に、皮膚に塗布する模擬クリームとして、NB 液体培地に POA を 0 または 0.001～0.25%懸濁し、2 mg/cm$^2$ となるように、先程の NB 寒天培地に塗布した。培養後、生育した菌を回収し、卵黄添加マンニット食塩寒天培地を用いて、*S. aureus* と *S. epidermidis* の違いを判別した。その結果、pH6.0 のとき、模擬クリーム中に 0.03%の POA が含まれるとき、*S. aureus* が完全に抑制され、*S. epidermidis* のみが生育した。この塗布した POA は 0.6 μg/cm$^2$ に相当し、健常者の皮膚の SA 平均含量 2 μg/cm$^2$ よりも小さかった。一方、pH7.5 のとき、模擬クリーム中に POA が 0.25%含まれていても（塗布量 5 μg/cm$^2$）、*S. aureus* と *S. epidermidis* の両方がほぼ同量生育した。これは、弱酸性の健常者の皮膚では *S. aureus* が殆ど見出されないこと、中～弱アルカリ性の AD 患者の皮膚では *S. aureus* が顕著に増大することを再現しており、AD 患者で SA 含量が低下することを含めて、AD の発症機構の 1 つと考えられる。

antibacterial activity, palmitoleic acid, *Staphylococcus aureus*

発表責任者：永尾寿浩（nagao@omtri.or.jp）

講演番号：2C19p16
講演日時：3 月 18 日 18:05～ C 校舎 19 会場

*Pseudomonas resinovorans* CA10dm4 株はプラスミド「非感受性」の宿主である
Plasmid-carriage cannot induce fitness cost in *Pseudomonas resinovorans* CA10dm4
○河野 響、上田 朋美、水口 千穂、岡田 憲典、野尻 秀昭（東大・生物工学セ）
○Hibiki KAWANO, Tomomi UEDA, Chiho Suzuki-Minakuchi, Kazunori Okada, Hideaki Nojiri (The Univ. of Tokyo)

【背景】プラスミドは可動性遺伝因子の一つであり、宿主に薬剤耐性などの新規形質を与える一方で、しばしば宿主の生育にも負荷を与えることが知られている。しかし実際にはプラスミド保持株も環境中で生残しており、このような宿主はプラスミド保持に伴う負荷を軽減する何らかの機構を持つと予想される。昨年度本大会では、環境中から単離された際にプラスミドを保持していた宿主 (original host) においてプラスミド保持に伴う負荷が認められないことを報告した。同時に、カルバゾール分解プラスミド pCAR1 (IncP-7) の original host である *Pseudomonas resinovorans* CA10dm4 株は、トルエン分解プラスミド pWW0 (IncP-9) を保持しても負荷が認められないことを報告した。本研究ではこの現象に着目し、CA10dm4 株に様々なプラスミドを保持させた際の負荷の定量を行った。
【方法】薬剤耐性プラスミド RP4 (IncP-1)、Rms148 (IncP-7)、R388 (IncW)、芳香族化合物分解プラスミド pDK1K (IncP-7)、NAH7K2 (IncP-9)、新規形質付与に関与するアクセサリー領域を持たない pBP136 (IncP-1) を用いて、CA10dm4 株における負荷の定量を行った。なお負荷の定量に際しては、プラスミド保持株と非保持株を等量混合したものを計 144 時間継代培養し、24 時間ごとに各時間におけるプラスミド保持株の比率を培養開始時のプラスミド保持株の比率で除した値 (competitive index) を算出する competition assay を用いた。
【結果】pCAR1 を *P. putida* KT2440 株に保持させた場合、同様の競合培養後にはプラスミド保持株の比率は 0.1~0.01%まで減少したのに対し、CA10dm4 株ではいずれのプラスミドを用いた際にもプラスミド保持株の比率は培養開始時からほぼ変動せず、プラスミド保持に伴う負荷は認められなかった (図)。また、プラスミド保持株の単独培養時にプラスミドの脱落は見られず、さらに競合培養中に接合伝達により生じるプラスミド保持株は全菌数の 0.3%以下であり、接合伝達が competitive index の算出に与える影響は無視できると判断した。以上より、CA10dm4 株は様々なプラスミドを保持しても負荷を受けない、すなわちプラスミド保持に対して「非感受性」の株であり、プラスミドが宿主に付与する新規形質だけを獲得できる特異な株であることが明らかとなった。

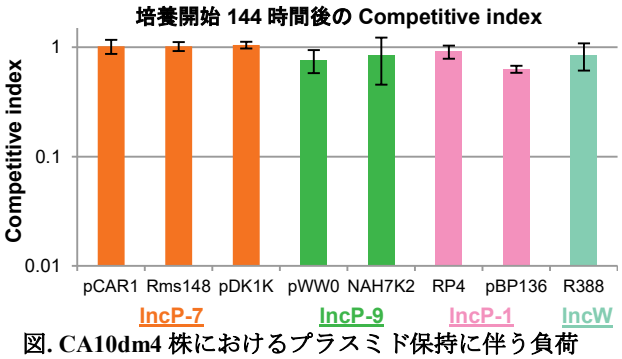


**図. CA10dm4 株におけるプラスミド保持に伴う負荷**
縦軸は培養開始 144 時間後の competitive index を、横軸は用いたプラスミド名を示す。Competitive index が 1 であることはプラスミド保持に伴う負荷が認められないことを示す。

plasmid, fitness cost, *Pseudomonas*

発表責任者：野尻秀昭（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2C20a01
講演日時：3 月 18 日 09:20～ C 校舎 20 会場

ストレプトマイシンがメカノセンシティブチャネルの開口特性に与える影響
The influence of streptomycin on the gating property of mechanosensitive channels
○野畑 和宏[1]、橋本 賢一[1]、中山 義敬[2]、川崎 寿[1] ([1]東電大院工・物質工、[2]ビクターチャン心臓病研究所)
○Kazuhiro NOBATA[1], Kenichi HASHIMOTO[1], Yoshitaka NAKAYAMA[2], Hisashi KAWASAKI[1] ([1]Tokyo Denki Univ., [2]Victor Chang Cardinac Research Institute)

[背景] 現在、結核菌の潜在的感染者数は 20 億人と推定されており、年間 150 万人が結核のため命を落としている。多剤耐性菌の出現は憂慮すべき事態であり、これまで知られていなかった作用に基づく新しい治療法の開発が切望されている。ストレプトマイシンは結核の治療に用いられた最初の抗生物質であり、細胞内のリボソームと結合することでタンパク質の合成を阻害する。しかし、細胞内への詳細な侵入機構は未だ不明瞭な点が多い。我々はこの結核菌と同様にペプチドグリカンの外側に、アラビノガラクタン層、ミコール酸層を有する *Corynebacterium glutamicum* においてストレプトマイシンの細胞内への侵入機構を解明することができれば、結核に対する効果的な治療法の開発に繋がると考えている。ミコール酸層は多くの抗生物質の透過障壁として機能することが分かっており、この特殊な細胞表層構造を持つ微生物に対して生育抑制を誘導する抗生物質は、特異的な侵入機構を有している可能性が考えられる。2014 年、大腸菌におけるメカノセンシティブチャネルが細胞内へのストレプトマイシンの侵入に関与していることを示唆することが報告された。我々は *C. glutamicum* におけるメカノセンシティブチャネルとストレプトマイシンの関連性について検討を行った。

[方法及び結果] *C. glutamicum* はゲノムにメカノセンシティブチャネルをコードする遺伝子、*mscL*, *NCgl1221*(*mscCG*)を有する。これらのチャネル欠損株はストレプトマイシンへの感受性が低下することが見出された。興味深いことにこの感受性の低下は、大腸菌とは異なり、MscS と相同性のある MscCG に依存することが明らかとなった。*C. glutamicum* において MscCG はグルタミン酸を細胞外に排出する主要担体であることを我々は明らかにしている。ストレプトマイシンが MscCG の開口に関与しているのであれば、ストレプトマイシンによる生育抑制条件でも細胞外にグルタミン酸が排出されることが予想される。単位細胞当たりの培養上清のグルタミン酸排出量を計算すると、MscCG 欠損株よりも野生株のほうがストレプトマイシン添加条件におけるグルタミン酸排出量が多かった。これは、間接的にストレプトマイシンが MscCG の開口性を上昇させたと考えることができる。MscCG のシングルチャネル活性が確認できるパッチクランプの条件において、ストレプトマイシンの影響下におけるチャネルの開口頻度が約二倍に上昇した。この結果もストレプトマイシンは MscCG の開口性を上昇させることを示唆する。本発表では、ストレプトマイシン添加における *C. glutamicum* のメカノセンシティブチャネルの開口特性にどのような変化があるか検討した結果について報告する。

*Corynebacterium glutamicum*, streptomycin, mechanosensitive channel

発表責任者：川崎寿（kawasaki@cck.dendai.ac.jp）

講演番号：2C20a02
講演日時：3 月 18 日 09:35～ C 校舎 20 会場

メカノセンシティブチャネルが熱ストレス後の細胞生存に関与する
he mechanosensitive channels involved in the cell survival under heat shock stress
○神杉 裕輝、高倉 有太、野畑 和宏、橋本 賢一、川崎 寿（東電大工・環境化）
○Yuuki KAMISUGI, Yuuta TAKAKURA, Kazuhiro NOBATA, Kenichi HASHIMOTO, Hisashi KAWASAKI (Tokyo Denki Univ.)

[背景]
細胞はその生存を脅かす様々な環境変化に対応する仕組みを持っている。土壌微生物などは降雨などにより細胞外環境の急激な浸透圧の低下に晒される可能性がある。細胞膜は半透膜として働くため、膨圧が上昇することで細胞が破裂する危険性がある。この際、メカノセンシティブチャネルは細胞膜張力の上昇により開口し、細胞内の低分子物質を細胞外へ排出することで膨圧を低下させ、溶菌を防止する働きをする。

2014 年、大腸菌におけるメカノセンシティブチャネルが細胞内へのストレプトマイシンの侵入に関与することが示唆された。この働きはメカノセンシティブチャネルが低浸透圧ストレスに対する安全弁として働くエクスポーターとしての機能だけではなく、インポーターとしても機能することを示唆する。我々はこれまで行ってきたメカノセンシティブチャネルの解析の中で、このチャネルを欠損した細胞膜は電気パルスに対して弱化する傾向を確認している。メカノセンシティブチャネルは細胞膜の弾性限界より低い張力により可逆的に構造を大きく変化させる。このため、細胞膜にかかる機械的な力を緩和することで、その安定性に関与しているのではないかと考えた。

*Corynebacterium glutamicum* は工業的なグルタミン酸生産菌であり、物質生産の過程において自身の発酵熱による効率の低下が問題となる。我々はメカノセンシティブチャネルが熱ストレスにも関与するのではないかと考え、メカノセンシティブチャネル変異株における熱ストレスに対する感受性評価を行った。

[方法及び結果]
*C. glutamicum* の生育指摘温度である 31.5℃と熱ストレス条件である 52℃において、野生株とメカノセンシティブチャネル欠損株で細胞の生存性にどのような影響があるか検討を行った。31.5℃の非熱ストレス条件ではメカノセンシティブチャネル欠損によって生育に差が見られなかった。興味深いことに、メカノセンシティブチャネルを欠損した株では 52℃の熱ストレス条件において細胞の生存性が低下する傾向が確認された。この結果はメカノセンシティブチャネルが熱ストレスに対する耐性を向上させる働きをすることを示唆する。本発表では、メカノセンシティブチャネルの種類に応じた熱ストレスに対する感受性への関与について報告する。

*Corynebacterium glitamicum*, mechanosensitive channel, heat stress

発表責任者：川崎寿（kawasaki@cck.dendai.ac.jp）

講演番号：2C20a03
講演日時：3 月 18 日 09:50～ C 校舎 20 会場

細菌のペプチドグリカン層に対する $TiO_2$ 光触媒反応の影響
The effect of the $TiO_2$ photocatalytic reaction to bacterial peptidoglycan layer
○大嶋 佑治[1]、芦田 美稀[1]、荻原 稜平[1]、岡本 歩未[1]、藤嶋 昭[2]、鈴木 智順[1,2]（[1]東理大 応生、[2]東理大 総研）
○YUJI OHSHIMA[1], MIKI ASHIDA[1], RYOUHEI OGIHARA[1], AYUMI OKAMOTO[1], AKIRA FUJISHIMA[2], TOMONORI SUZUKI[1,2] ([1]Department of Applied Biological Science, Tokyo University of Science, [2]Research Institute for Science & Technology, Tokyo University of Science)

【目的】 人体への影響も懸念される消毒剤に代わる新たな殺菌技術として光触媒効果がある。光触媒による殺菌効果は、紫外光を照射することで自身が産生する活性酸素種の強い酸化力によるものである。しかし、光触媒反応による殺菌のメカニズムについては明確な知見が得られていない。現在の知見の中に、グラム陽性細菌はペプチドグリカン層が厚いためにグラム陰性細菌より殺菌効果が低いという報告がある。一方で、活性酸素種はペプチドグリカン層を通過し、外膜や内膜のみで反応が起こるという報告もあり、外膜をもたないグラム陽性細菌の方がグラム陰性細菌よりも殺菌されやすいと考えることもできる。以上のように、細胞壁に対する光触媒反応には相反する報告が存在する。そこで本研究では、活性酸素種の寿命の短さ、反応性の高さで、活性酸素種がペプチドグリカン層を通過できるのかを、グラム陽性細菌である乳酸菌のプロトプラスト細胞を作製し、未処理の乳酸菌との死滅速度の違いに着目して、ペプチドグリカン層に対する光触媒反応の影響を探ることを目的とした。これまでの我々の研究で、高形成率で作製した *Lactobacillus plantarum* JCM1149$^T$ のプロトプラストに対して、BacLight 蛍光試薬による膜損傷評価を行ったところ、プロトプラスト化することで光触媒による生存率の低下が抑制されることが示唆された。また、細胞壁融解活性のないタンパク質を添加して生存率測定を行った結果、タンパク質存在下でも光触媒による不活化が起きている可能性が示唆された。そこで今回は、タンパク質の添加が細菌の不活化に与える影響並びに、ペプチドグリカンが不活化に与える影響について評価を行った。
【方法】 ペプチドグリカン層の有無による死滅速度の違いを見るために、芽胞を形成しないグラム陽性桿菌である *L. plantarum* JCM1149$^T$ のプロトプラストを作製した。作製したプロトプラスト細胞と、細胞壁融解酵素の代わりとして、同量の BSA を添加した通常細胞に対して、BacLight 蛍光試薬を添加し、$TiO_2$ コーティングガラス上で UVA を照射して光触媒反応を行った。照射後、共焦点顕微鏡で観察し、生存率評価を行った。
【結果】 これまでの我々の研究で、現在の評価法ではタンパク質である細胞壁融解酵素が光触媒反応を弱めている可能性があることが示唆された。そこで、タンパク質の存在が光触媒反応による殺菌効果に影響を与えるのかを評価したところ、タンパク質が高濃度になるにつれ、不活化速度が遅くなるが、タンパク質存在下でも光触媒による不活化が起きていることが示唆された。つまり、ペプチドグリカンの存在が細菌の不活化に何らかの形で関わっていることが示された。そこで今回は、細菌懸濁液中のペプチドグリカンの濃度を変えて光触媒反応を行い、それによって細菌の不活化速度に違いを生じるのかを確認し、ペプチドグリカンが細菌の不活化に与える影響についてより詳細な解析を行い、報告する予定である。

photocatalysis, killing mechanism, bacteria

講演番号：2C20a04
講演日時：3 月 18 日 10:05～ C 校舎 20 会場

# 真菌に対する光触媒反応の影響

# The effects of the photocatalytic reaction to fungi

○梶原 雄太郎[1]、並木 康之[1]、池北 雅彦[2]、藤嶋 昭[2]、鈴木 智順[1,2] ([1]東理大 応生、[2]東理大 総研)
○YUTARO KAJIWARA[1], YASUYUKI NAMIKI[1], MASAHIKO IKEKITA[2], AKIRA FUJISHIMA[2], TOMONORI SUZUKI[1,2] ([1]Department of Applied Biological Science, Tokyo University of Science, [2]Research Institute for Science & Technology, Tokyo University of Science)

【目的】　近年、世界的な気候変動による異常な降水量の増加により湿度の上昇がもたらされ、屋内の真菌（カビ）の存在量の増加を招いており、人体に対してアレルギーや感染症、呼吸器疾患をもたらす要因となっている。この対策として殺菌剤よりも人体に影響の少ない光触媒反応による殺菌が注目されている。真菌の細胞壁は、キチンやβ-グルカンなどの多糖類から構成されており、細菌と比較して光触媒による殺菌が難しいことが知られている。また、当研究室のこれまでの研究から、真菌の種類や形態、メラニン色素の有無によって光触媒反応による不活化効率に違いがあることが示されている。そこで本研究では、*Aspergillus niger* JCM16264 の胞子、*Aspergillus oryzae* SG01 の胞子、*Saccharomyces cerevisiae* IAM4512 に対して $TiO_2$ コーティングガラスによる光触媒反応を作用させ、真菌の種類の違いや色素の有無が $TiO_2$ 光触媒反応に影響を与えるかどうかを確認した。
【方法】　日本工業規格（JIS）の JIS R-1702 に準じた評価系を構築し、各真菌に対して光触媒反応を作用させた。UVA 照射時間は 0～24 時間の範囲とし、4 時間おきに実験評価系から $TiO_2$ コーティングガラスを回収した。回収した $TiO_2$ コーティングガラスから菌体を回収した。コロニー計数法では、回収した菌液を段階希釈して PDA プレートに播種し、形成したコロニーをカウントして各 UVA 照射時間における真菌の生存率を算出した。また、回収した菌体をアルデヒド-オスミウム酸二重固定し、スパッタコーティングした後、卓上走査型電子顕微鏡（SEM）で細胞構造を観察した。
【結果】　$TiO_2$ 存在下で UVA 照射を行うと、*A. niger* JCM16264 の胞子は 8 時間後に、*A. oryzae* SG01 の胞子は 24 時間後に 1%以下まで生存率が低下した。同じ *Aspergillus* 属の胞子でも、メラニン色素を持つ *A. niger* JCM16264 より、*A. oryzae* SG01 の方が完全な不活化に時間を要する結果となった。*S. cerevisiae* IAM4512 では UVA 照射 12 時間後に 1%以下まで生存率が低下したが、光触媒を用いずに UVA を照射した条件においても、照射開始から 4 時間後には約 58%まで、12 時間後には 1%以下まで生存率が低下したため、光触媒反応の正確な影響を確認できなかった。真菌の種類によって生存率低下の推移に違いがみられた。また、SEM による細胞構造変化の解析を *A. oryzae* SG01 の胞子について行った結果、光触媒反応の前後で胞子表面の構造が変化した。今後はさらに SEM による観察を行い、光触媒反応によって菌体表面に損傷が起こり始める詳しい時間を特定し、コロニー形成能の推移と関係があるのかどうかを各真菌について見ていく予定である。

photocatalysis, killing mechanism, fungi

講演番号：2C20a05
講演日時：3 月 18 日 10:20～ C 校舎 20 会場

# 生物学的処理および光触媒・boron-doped diamond 電極併用汚水浄化システムの構築と評価

# Analyses of hybrid wastewater purification system using biological treatment, photocatalyst and boron-doped diamond electrode

○井手口 真理[1]、佐藤 俊貴[1]、落合 剛[2,3]、森戸 祐幸[2,4]、藤嶋 昭[2,3]、鈴木 智順[1,2]([1]東理大 応生、[2]東理大 総研、[3]KAST、[4]ユーヴィックス株式会社)
○MARI IDEGUCHI[1], TOSHIKI SATO[1], TSUYOSHI OCHIAI[2,3], YUKO MORITO[2,4], AKIRA FUJISHIMA[2,3], TOMONORI SUZUKI[1,2] ([1]Department of Applied Biological Science, Tokyo University of Science, [2]Reserch Institute for Science & Technology Tokyo University of Science, [3]Kanagawa Academy of Science and Technology, [4]U-VIX corporation)

〔目的〕
生活汚水による生態系への悪影響を防ぐため、さまざまな汚水処理の技術が存在するが、コストや有害物質の発生といった問題が指摘されている。これらの問題を解決する一つの手段として、光触媒による酸化反応や boron-doped diamond (BDD)電極を利用した技術などが注目されている。そこで本研究では、汚水に含まれる有機物や微生物の処理に有効な光触媒および BDD 電極を生物学的処理後の処理水のさらなる浄化処理に利用することで、より低コストで環境への負荷の少ない汚水処理システムを構築することを目的とした。
〔方法〕
本システムの有機物分解能を評価するために、当研究室に設置されている循環型汚水浄化装置の生物学的処理水に対して、光触媒反応および BDD 電極反応をそれぞれ作用させ、一定時間ごとに TOC を測定した。さらに、16S rRNA 遺伝子を用いた PCR-DGGE 法を用いて、光触媒・BDD 電極併用処理前後の処理水中の細菌叢変動解析を行い、本システムで殺菌できない細菌（耐性菌）が存在するか調査した。この際に、生細胞由来の DNA のみを増幅することができる viability PCR 法を用いた PCR-DGGE 法を行った。
〔結果〕
循環型浄化槽に定着した微生物群の有機物分解能評価の結果、7,000 mg/L であった有機物量が約 48 時間で 1,500 mg/L まで減少し、循環型浄化装置の有効性が確認された。その生物学的処理水に対して光触媒反応および BDD 電極反応をそれぞれ作用させたところ、光触媒と BDD 電極を併用した場合に特に高い有機物分解能を示すことが分かった。さらに、生物学的処理水に対して光触媒と BDD 電極を併用して処理を行った場合の処理前後の細菌叢変動解析を行った。PCR-DGGE 法による細菌叢変動解析の結果、処理後にはバンドの多様性の減少が確認できた一方で、それぞれの処理に対する耐性菌の存在が示唆された。また、viability PCR 法を用いた PCR-DGGE 法による細菌叢変動解析の結果では、従来の PCR-DGGE 法で死菌の DNA が増幅されていた可能性が示された一方で、この方法においても複数のバンドが確認できた事から耐性菌の存在が示唆される結果となった。以上の結果から、光触媒による酸化反応と BDD 電極による電気分解反応および酸化剤生成反応を利用した本システムが、より高い殺菌性能および有機物分解能を発揮する一方で、本システムへの耐性菌の存在も示唆された。

wastewater purification, photocatalyst, boron-doped diamond electrode

発表責任者：井手口真理（6416607@ed.tus.ac.jp）

講演番号：2C20a06
講演日時：3 月 18 日 10:45～ C 校舎 20 会場

*Corynebacterium glutamicum* における 2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ制御因子 OdhI のアシル化部位の機能解析

The functional analysis of acylation sites in OdhI, a regulatory factor of 2-oxoglutarate dehydrogenase in *Corynebacterium glutamicum*

○阿部 理乃[1]、西山 真[1]、古園 さおり[1,2] ([1]東大・生物工学セ、[2]理研 CSRS)
○Ayano ABE[1], Makoto NISHIYAMA[1], Saori KOSONO[1,2] ([1]UTokyo-BRC, [2]RIKEN-CSRS)

アセチル化やスクシニル化などのアシル化修飾は、生物種を超えて保存された翻訳後修飾として近年注目されており、アシル化修飾による代謝酵素の活性調節の例が報告されている。*Corynebacterium glutamicum* は Tween40 添加等の刺激によりグルタミン酸を過剰生産する。グルタミン酸の過剰生産には、TCA 回路中で 2-オキソグルタル酸からスクシニル CoA への反応を触媒する 2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ(ODH)の活性低下が重要と言われている。ODH 活性の負の制御因子として OdhI が知られており、ODH の E1o サブユニットへ結合することによりその活性を阻害する。OdhI はリン酸化 Ser/Thr を認識する FHA ドメインを有する約 15 kDa のタンパク質で、リン酸化により分子内フォールディングが変化して E1o への結合が制御される。当研究室で実施されたアシローム解析から OdhI にアセチル化及びスクシニル化修飾が見出され、OdhI を介した ODH 活性調節やグルタミン酸生産への影響に興味が持たれた。本研究では、ODH-E1o サブユニットとの相互作用に関わるリジン残基 K132 のアシル化の役割について詳細な解析を行った。

アシローム解析の結果、グルタミン酸生産条件で OdhI-K132 のスクシニル化レベルが上昇していたことから、グルタミン酸生産に何らかの役割を持つ可能性を考えた。スクシニル化修飾模倣変異を導入した OdhI-K132E 株では、非アシル化修飾模倣変異を導入した OdhI-K132R 株と比べてグルタミン酸生産量が顕著に減少した。大腸菌で発現・精製した OdhI タンパクと ODH-E1o タンパクを用いてプルダウンアッセイを行った結果、OdhI-K132E 変異タンパクは野生型 OdhI や OdhI-K132R 変異タンパクと比べて E1o タンパクに対する結合能が低下していた。さらに、OdhI 組換えタンパクを OdhI 欠損株の菌体破砕液に添加して ODH 活性への阻害効果を評価したところ、K132E 変異タンパクは野生型や K132R 変異タンパクと比べて ODH 活性の阻害能力が著しく低下していた。

以上の結果から、恐らく OdhI-K132 のスクシニル化は OdhI の E1o サブユニットに対する結合能を低下させることで ODH 活性への阻害効果を弱め、グルタミン酸生産量を減少させることが示唆された。OdhI はリン酸化だけでなくスクシニル化による制御も受けて、グルタミン酸生産の調節に関与していると考えられる。

protein acylation, *Corynebacterium glutamicum*, 2-oxoglutarate dehydrogenase (ODH)

発表責任者：古園さおり（uskos@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2C20a07
講演日時：3 月 18 日 11:00～ C 校舎 20 会場

Corynebacterium glutamicum 由来 Phosphoenolpyruvate carboxylase における Pup 化修飾の機能解析
Functional analysis of pupylation on Phosphoenolpyruvate carboxylase from Corynebacterium glutamicum
○濱本 勇磨[1,2]、永野 愛[2]、西山 真[1]、古園 さおり[1,3]（[1]東大生物工学セ、[2]協和発酵バイオ、[3]理研 CSRS）
○ Yuma HAMAMOTO[1,2], Megumi NAGANO[2], Makoto NISHIYAMA[1], Saori KOSONO[1,3] ([1]UTokyo-BRC, [2]KYOWA HAKKO BIO, [3]RIKEN-CSRS)

グルタミン酸発酵生産菌として知られる *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 株には、prokaryotic ubiquitin-like protein (Pup)と呼ばれる翻訳後修飾が存在する(1)。Pup 化修飾は、近縁の Mycobacterium 属細菌では真核生物におけるユビキチン化のようなタンパク質分解シグナルとして働くことが報告されているが、ATCC13032 株にはプロテアソームに相当する遺伝子がゲノム上に存在せず、ferritin タンパクのアンフォールディングに関与することが最近報告された(2)。本研究では、ATCC13032 株のグルタミン酸生産に重要な補充経路酵素である Phosphoenolpyruvate carboxylase (NCgl1523；PEPC)の Pup 化修飾の役割について検討した。当研究室で、PEPC は 653 番目のリジン残基（K653）のアセチル化によって活性調節を受けることを明らかにしている。Pup 化はアシル化と同様にリジン残基を標的とすることから、Pup 化の PEPC 活性調節への関与に興味が持たれた。

*C.glutamicum* ATCC13032 株の Pup（NCgl1438)欠損株ではグルタミン酸生産の低下が認められ、Pup がグルタミン酸生産に対して何らかの機能を持つことが推測された。大腸菌で発現・精製した Pup、PafA（NCgl1437)を用いて精製 PEPC を基質とした *in vitro* Pup 化反応を行ったところ、ウェスタンブロット法により Pup 化 PEPC（Pup-PEPC）を検出した。LC-MS/MS 解析の結果、合計 8 ヶ所の Pup 化部位を同定したが、K653 における Pup 化は検出されなかった。Pup 化修飾部位に対するアラニン置換変異株を作成したところ、893 番目のリジン残基をアラニンに置換した変異（PEPC-K893A）株においてグルタミン酸生産遅延を観察した一方で、細胞内の PEPC 活性と PEPC タンパク量は親株と同程度であった。Pup 化部位のアラニン置換体を大腸菌で発現・精製して PEPC 活性を評価したところ、739 番目のリジンをアラニンに置換した変異体（K739A）において有意な活性上昇が認められた。*E.coli* 由来 PEPC 結晶構造とアミノ酸配列データから K739 は活性部位の近傍に位置すると推測され、K739 の Pup 化が活性に影響を及ぼす可能性が考えられた。一方で、*in vitro* Pup 化 PEPC は未反応の PEPC に比べて酵素の安定性が向上することが示唆されている。現在、PEPC における Pup 化修飾の機能ついてメカニズムの解明に向けた検討を行っている。

1. A. Kuberl et al., Proteomics, 14:1531, 2014.
2. A. Kuberl et al., PNAS, 113:4806, 2016.

Corynebacterium glutamicum, Prokaryotic ubiquitin-like protein (Pup), Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC)

講演番号：2C20a08
講演日時：3 月 18 日 11:15～ C 校舎 20 会場

# 包括的土壌評価システムの実現に向けて

# Feasibility study of comprehensive soil evaluation system

○万里 千裕、大熊 康介、鈴木 聖一、吉野 定男、五十嵐 由美子（日立製作所）
○Chihiro MANRI, Yasuyuki OKUMA, Seiichi SUZUKI, Sadao YOSHINO, Yumiko IGARASHI (Hitachi, Ltd.)

【背景・目的】土耕精密農業実現に向け，複雑で多様なばらつきをもつ圃場に対し，地力構成要素である物理性・化学性・生物性を包括的に評価するシステムの構築を目指している。本研究では，化学性として土壌成分情報が，生物性として土壌微生物叢情報が精密農業に有用であることを確認することを目的に，新規に耕作した畑に対し，カラーピーマンを栽培し，土壌成分情報に基づく施肥管理と微生物叢解析を実施した結果を報告する。
【方法・結果】新規に耕作した畑に対し，無施肥区（0 区），慣行農業区（H 区），精密農業区（S 区）の 3 区画を設けた。S 区は 2 週に一回程度，サンプリングした土壌の成分分析を実施し，不足成分を追肥した。追肥には成分値が明確な化成肥料を用いた。その結果，1 株あたりの平均収穫個数は，0 区 5.7 個，H 区 12.1 個，S 区 12.6 個となり，0 区は他の 2 区画と比較して少なかった。一方，1 株あたりの平均収穫重量は，0 区 41.6g，H 区 58.3g，S 区 71.4g となり，S 区が他の 2 区画と比較して大型の果実を収穫した。以上より，土壌成分情報に基づく施肥管理が精密農業に有用であることを確認した。
次に各区画からサンプリングした土壌から DNA を抽出し，糸状菌叢（18S rRNA）を解析対象とした PCR-DGGE 法を行い，系統樹解析を実施した。その結果，追肥の違いによる区画ごとに糸状菌叢が系統分類されることを確認した。これは，一般細菌叢（16S rRNA）を解析対象としたメタゲノム解析（（株）テクノスルガ・ラボ社に依頼）の結果からも確認できた。同じ畑内であっても，施肥や収量の違いにより微生物叢に特徴がみられたことから，土壌微生物叢情報が精密農業に有用であることが示唆された。
以上より，化学性である土壌成分情報と生物性である土壌微生物叢情報がいずれも，精密農業に有用であることを確認した。今後は，包括的土壌評価システムの実現に向けて物理性情報や気象情報なども取得し有効性を確認すると共に，栽培事例を蓄積しデータベースを構築していく。

fertilizer management, PCR-DGGE

発表責任者：万里　千裕（chihiro.manri.kf@hitachi.com）

講演番号：2C20a09
講演日時：3 月 18 日 11:30～ C 校舎 20 会場

# 加圧熱水処理によるフェノール系抗菌剤の殺菌性向上メカニズムの解析

# Antibacterial mechanism of IPMP treated with pressurized hot water

○田邊 弘毅、宮原 佳子、宇田 晶宏、高橋 塁、岩井 秀隆、阿部 哲也、遠藤 浩二、土倉 豊樹、永井 智、久保田 浩美（花王）
○Hiroki TANABE, Yoshiko MIYAHARA, Akihiro UDA, Rui TAKAHASHI, Hidetaka IWAI, Tetsuya ABE, Koji ENDO, Toyoki HAGURA, Satoshi NAGAI, Hiromi KUBOTA (Kao corp.)

【背景・目的】

抗菌剤・殺菌剤・防腐剤等は、感染症の予防または微生物による製品の微生物汚染や変質の防止等を目的として、香粧品・医薬品・食品・日用品等の製品に広く配合されており、公衆衛生や微生物学的品質の確保の面から非常に有用である。特に、イソプロピルメチルフェノール（IPMP）やパラベン類等のフェノール系抗菌剤は優れた抗菌作用を有しており、香粧品・日用品等に広く用いられている。

一方、フェノール系抗菌剤は、常温では固体で難水溶性のものが多く、界面活性剤もしくはアルコール等の有機溶媒で可溶化させて用いるのが一般的であるが、可溶化剤の影響により抗菌効果が低下することや配合可能な製品が制約されることがある。そこで、我々は難水溶性物質の水への溶解性を高める技術の開発を試み、これまでに、IPMP と 1,3-ブチレングリコール（1,3-BG）を 150℃で 1 分間加圧熱水処理することにより、IPMP の溶解性および殺菌性が向上することを見出した[1]。

【方法・結果】

加圧熱水処理後の IPMP（加圧熱水処理 IPMP）の殺菌性向上のメカニズムについて、常法で溶解した IPMP（室温溶解 IPMP）の作用メカニズムと比較することで推測した。

フェノール系化合物の菌体への作用として、細胞膜の損傷およびタンパク質の機能阻害が報告されている[2]。そこで、加圧熱水処理を施すことによる IPMP の作用点の変化の有無を解析するために、各溶解法で調製した IPMP を用いた殺菌過程において菌数減少値が同じ際の細胞膜損傷性、タンパク質機能阻害性および菌体の形状変化を比較した。その結果、どちらの溶解法で調製した IPMP でも膜損傷性およびタンパク質機能阻害性が認められ、それらは両者間で有意な差はなかった。また、両者を作用させた際の菌体形状の変化にも大きな差異は認められなかった。これらの結果から、本殺菌条件での加圧熱水処理および室温溶解 IPMP の菌体に対する主な作用点はいずれも膜およびタンパク質であることが示唆され、加圧熱水処理 IPMP による殺菌では菌体への作用速度が向上している可能性が考えられた。

[1] 田邊ら　日本防菌防黴学会　第 43 回年次大会
[2] Fitzgerald, D. J., *et al. Journal of applied microbiology* 97.1 (2004): 104-113.

antimicrobial technology, isopropyl methylphenol, solubilization

発表責任者：田邊弘毅（tanabe.hiroki@kao.co.jp）

講演番号：2C20a10
講演日時：3 月 18 日 11:45～ C 校舎 20 会場

# 東京湾に生息する Mimivirus 科ウイルスの分離と解析

# Analyses of a new Mimiviridae family member, isolated from Tokyo bay

○三上 達也、武村 政春（東理大）
○Tatsuya MIKAMI, Masaharu TAKEMURA (Tokyo Science Univ.)

【背景・目的】*Acanthamoeba polyphaga mimivirus*(APMV)の発見以降、アメーバ感染性大型 DNA ウイルスの研究が盛んに行われるようになった。これらウイルスは光学顕微鏡で観察できるほどのウイルス粒子径、小さな細菌と変わらないゲノムサイズを有することから、巨大ウイルス(Giant Virus ; GV)と呼ばれている。GV は既存のウイルスが有していなかった遺伝子、粒子構造、複製サイクルを有することが明らかとなっており、より詳細な解析が必要とされている。しかし、GV に対する知見は少なく、日本での研究例も少ない。そこで本研究では、日本の環境から新規性のある GV を探索、分離し、網羅的に解析することを目的とした。

【方法】GV の探索は、Rice media 法を用いて行い、サンプルは葛西臨海公園の海水、宿主は *Acanthamoeba castellanii*(アメーバ)を用いた。Rice media 法とは、20 粒の米粒を入れてオートクレーブした 1 L の海水をサンプルに 4%となるように加え、1 か月冷暗所で保存した後、宿主に滴下する方法である。アメーバは、それを宿主とする GV が感染すると細胞変形や細胞破壊が観察されることが知られており、それを指標として GV の探索を行った。細胞変形が確認されたアメーバにおいて DAPI 染色を用いてウイルス工場（VF）を観察し、GV の存在を確かめた後に、GV のクローニングを行った。クローニング後、GV の種を特定するために、透過型電子顕微鏡(TEM)による形態解析と、全ゲノム解析を行い、他の GV との比較を行った。

【結果と考察】葛西臨海公園の海水から分離したウイルスは、TEM での観察により *Mimivirus* 科の特徴である表面繊維をもったウイルス粒子が確認できたこと、ならびに全ゲノム解析の比較解析から、APMV に非常に近いウイルスであることがわかった。APMV に似た種であることから、*Mimivirus kasaii* と命名した。今回用いた探索法である Rice media 法は *Mimivirus* 科ウイルスの探索に使われていた方法であり、その結果似たタイプのウイルスが分離されたと考えられた。今後は分離したウイルスが何らかの特異的な性質を有するかを調べるために、*Mimivirus* 科の複製に関わる VF に着目し、各感染時間で TEM による観察やウイルス粒子の複製に関わる遺伝子の発現量の検出を行い、既存の *Mimivirus* 科ウイルスの VF との比較検討を行う予定である。

Giantvirus, Mimiviridae, Virion Factory

講演番号：2C20p01
講演日時：3 月 18 日 14:00～ C 校舎 20 会場

出芽酵母におけるホスホリパーゼ $A_1$ の生理学的機能の解析
Physiological function of phospholipase $A_1$ in *Saccharomyces cerevisiae*
○森貞 志穂[1]、西田 郁久[2]、川向 誠[2]、堀内 裕之[1]、福田 良一[1]([1]東大院・農生科・応生工、[2]島根大・生物資源・生命工)
○Shiho MORISADA[1], Ikuhisa NISHADA[2], Makoto KAWAMUKAI[2], Hiroyuki HORIUCHI[1], Ryouichi FUKUDA[1] ([1]Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo, [2]Dept. Life Sci. Biotechnol., Shimane Univ.)

【背景と目的】 ホスホリパーゼ $A_1$（$PLA_1$）は、生体膜の主要構成成分であるグリセロリン脂質の *sn-1* 位のアシル鎖を切断し、脂肪酸と 2-アシルリゾリン脂質を生成する酵素である。細胞質型 $PLA_1$（$cPLA_1$）は、酵母から高等動物まで真核生物に広く保存されており、出芽酵母では $cPLA_1$ は *DDL1* によりコードされている。Ddl1 はミトコンドリアに局在するタンパク質であり、網羅的解析により *DDL1* 破壊株は呼吸欠損となることが報告されている[1)]。また、*DDL1* 高発現株を用いた解析により、Ddl1 はホスファチジルエタノールアミン（PE）やカルジオリピン（CL）のアシル鎖のリモデリングや分解に寄与することが示唆されている[2)]。さらに、合成リン脂質を用いた *in vitro* での解析により、Ddl1 は PE、ホスファチジルコリン（PC）、ホスファチジン酸（PA）に対し $PLA_1$ 活性を有することも示されている[3)]。しかしながら、Ddl1 の細胞内での具体的な役割は不明である。そこで本研究では、出芽酵母の Ddl1 の細胞内機能の解明を目的とした。
【方法・結果】 出芽酵母において *DDL1* 破壊株を作製して生育を観察したところ、グルコースを炭素源とした培地での生育には異常は見られなかったのに対して、グリセロールやエタノールを炭素源とした培地では生育が悪化した。そこで、高発現することにより *DDL1* 破壊株のグリセロール培地での生育を回復させるサプレッサー遺伝子の探索を行ったところ、コエンザイム Q の生合成に必須の *COQ8* と *COQ9* が単離された。Coq8 はタンパク質キナーゼとして、コエンザイム Q 生合成複合体の形成を制御していると推定されている。Coq9 は機能未知であるが、ヒトの Coq9 ホモログである ADCK3 は結晶構造解析から脂質結合部位を有しリン脂質と結合することが報告されている。細胞内のコエンザイム Q を定量したところ、*DDL1* 破壊株ではコエンザイム Q 量が低下したのに対して、*COQ8* を高発現させた株ではコエンザイム Q 量の回復が見られた。これらの結果から、Ddl1 がコエンザイム Q の生合成に関与する可能性が考えられた。

1）Steinmetz, L. M. et al., *Nat. Genet.* 31:400-404 (2002)
2）Yadav, P. K. and Rajasekharan, R. *J., Biol. Chem.* 291:18562-18581 (2016)
3）Urafuji, K. and Arioka, M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 480:302-308 (2016)

*Saccharomyces cerevisiae*, phospholipase, coenzyme Q

講演番号：2C20p02
講演日時：3 月 18 日 14:15～ C 校舎 20 会場

出芽酵母液胞アミノ酸トランスポーターAvt4 の合成と合成後における調節について
The regulation of a vacuolar amino acid transporter Avt4 in *Saccharomyces cerevisiae* at the synthesis and post-synthesis steps.
○村上 瑛夢[1]、杉本 航[1]、兵頭 美波[1]、児玉 理美[1]、佐藤 有美香[1]、石本 晶也[1]、河田 美幸[1,2]、関藤 孝之[1] ([1]愛媛大農、[2]愛媛大学術支援セ)
○Emu MURAKAMI[1], Wataru SUGIMOTO[1], Mina HYODO[1], Satomi KODAMA[1], Yumika SATO[1], Masaya ISHIMOTO[1], Miyuki KAWADA[1,2], Takayuki SEKITO[1] ([1]Fac. Agr., Ehime Univ., [2]ADRES, Ehime Univ.)

液胞からのアミノ酸排出は窒素飢餓によって誘導されるオートファジーアミノ酸リサイクルの必須過程である。また、液胞内に高度に蓄積した塩基性アミノ酸は、窒素飢餓条件では速やかに減少する。これらは、窒素飢餓条件で液胞からサイトゾルへのアミノ酸排出活性が増加することを示唆する。AVT トランスポーターファミリーに属する Avt4 はオートファジーアミノ酸リサイクルにおいて他のトランスポーターと重複して液胞から中性・塩基性アミノ酸を排出する。我々は染色体上のネイティブプロモーターより発現させた GFP-Avt4 のウエスタンブロット解析より、窒素飢餓条件で GFP-Avt4 の細胞内レベルが増加することを見出した。また唯一の窒素源としてグルタミン存在下で培養した場合、細胞内レベルが低く抑えられ、プロリン存在下で培養した場合では逆に増加することを見出した。これまで窒素飢餓条件やプロリン存在下では Tor complex 1（TORC1）の不活性化によって多様なアミノ酸代謝関連因子の発現変化が報告されている。GFP-Avt4 レベルは TORC1 阻害剤であるラパマイシン添加によっても増加し、さらに TORC1 下流で機能するフォスファターゼ Sit4 を欠損すると、窒素飢餓条件での増加が見られなくなったことから、TORC1 により調節されることが示唆された。現在 *AVT4* mRNA が窒素飢餓条件下で増加することを見出しており、本発表では TORC1 活性の *AVT4* 転写誘導への関与について検討結果を報告したい。

Avt4 のトポロジーを予測すると N 末端側に約 300 アミノ酸残基の長い親水性領域が存在する。この長い親水性領域は真核微生物 Avt4 ホモログに普遍的に存在しており、これらのアライメントより、5 つの保存配列（I～V）を見出した。これら保存配列を欠損した変異型 Avt4 はいずれも液胞膜へと局在し、その細胞内レベルは野生型 Avt4 同様の栄養応答を示した。このうち保存配列 V を欠損した変異型 Avt4 の発現によって栄養豊富条件において液胞内アミノ酸含量が顕著に減少した一方で、保存配列 IV を欠損した変異型 Avt4 の発現では窒素飢餓条件で液胞内アミノ酸含量の減少が抑制されたことから、Avt4 N 末端親水性領域の保存配列が液胞からのアミノ酸排出に抑制的もしくは促進的に作用することが示唆された。以上の結果より、Avt4 の活性は栄養条件に応答して合成と合成後の両面で調節を受けると考えられた。

vacuole, amino acid transporter, *Saccharomyces cerevisiae*

講演番号：2C20p03
講演日時：3 月 18 日 14:30～ C 校舎 20 会場

出芽酵母セラミド合成酵素サブユニット Lip1 の機能解析
Functional analysis of ceramide-synthase regulatory subunit, Lip1 in budding yeast
石野 裕子[1]、吉川 大地[1]、谷 元洋[2]、橋井 圭介[1]、田中 直孝[1]、○田淵 光昭[1] ([1]香川大農、[2]九州大院理)
YUKO ISHINO[1], DAICHI YOSHIKAWA[1], MOTOHIRO TANI[2], KEISUKE HASHII[1], NAOTAKA TANAKA[1], ○MITSUAKI TABUCHI[1] ([1]Kagawa Univ., [2]Kyushu Univ.)

生体膜のスフィンゴ脂質を含む様々な脂質の量は精密に制御されており、高温ストレスなどの外的ストレスに応じて脂質量を変化させることによって膜の物性を変化させ、環境変化に適応している。しかしながら、スフィンゴ脂質代謝の活性制御メカニズムについては未だに不明な点が多い。

出芽酵母 Lip1 は、小胞体膜上に局在するセラミド合成酵素触媒サブユニットである Lag1/Lac1 と複合体を形成し、その活性を制御する制御サブユニットであると考えられている。Lip1 は、150 アミノ酸からなる推定 1 回の膜貫通ドメインを持つタンパク質であるが、Lip1 がどのようにして Lag1/Lac1 の機能を制御しているかは不明である。そこで、本研究ではセラミド合成における Lip1 の分子機能の解明を目的とし、Lip1 による Lag1/Lac1 の機能制御機構について解析した。

Lip1 の機能を明らかにするため、まず、*LIP1* をドキシサイクリン(Dox)依存的に発現の制御が可能な Tet-off プロモーターで置換した株の作製を試みた。染色体上の *LIP1* プロモーターを相同組換えにより Tet-off プロモーターに置換した株、約 30 株を取得し、これらの株の Dox 添加による増殖への影響を調べた。その結果、*LIP1-3* 株を含む殆どの株は Dox の添加により増殖阻害は見られなかったが、*LIP1-1* 株において明らかな Dox 依存的な増殖阻害が見られた。また、この Dox 依存的な増殖阻害は、野生型の *LIP1* を発現させることで回復し、さらに TLC 分析により *LIP1-1* 株では Dox 添加により著しいスフィンゴ脂質の合成異常が確認された。これらの結果より、Dox 依存的な Lip1 の発現抑制に伴うスフィンゴ脂質合成異常が増殖阻害の原因であることが確認された。そこで、*LIP1-1* 株および *LIP1-3* 株について染色体上の *LIP1* ORF 領域の塩基配列を確認したところ、*LIP1-3* 株では特に変異は見られなかったが、*LIP1-1* 株では N 末端コード領域付近で 1 塩基欠損しており、本遺伝子産物はフレームシフトにより推定の膜貫通ドメインを含む C 末端部分を大幅に欠損していることが予想された。次に、*LIP1-1* ORF 遺伝子の N 末端領域に FLAG タグを C 末端領域に HA タグを融合した遺伝子を作製し、ウエスタン分析により Lip1 タンパク質の発現を確認したところ、FLAG-*LIP1-1*-HA 遺伝子から 1 塩基欠損によりフレームシフトを起こしたと考えられる short form と発現量は少ないが野生型の FLAG-Lip1-HA と同じサイズに発現する long form の 2 つの特異的なバンドが検出された。これらの結果から、*LIP1-1* 株では、Dox 非添加による過剰発現時において 1 塩基欠損によるフレームシフトを抑圧して極僅かに正常な Lip1 タンパク質が発現することが考えられた。現在、この *LIP1-1* 株を用いて、セラミド合成における Lip1 の機能を解析している。

ceramide, sphingolipid, budding yeast

発表責任者：田淵光昭（mtabuchi@ag.kagawa-u.ac.jp）

講演番号：2C20p04
講演日時：3 月 18 日 14:45～ C 校舎 20 会場

出芽酵母の Erv14 は Erv25 と相互作用し Gasl の輸送に関与する
Erv14 interacts with Erv25 and is involved in the transport of Gasl in *Saccharomyces cerevisiae*
○高實 優、足立 博之、依田 幸司、野田 陽一（東大院・農生科・応生工）
○MASARU TAKAZANE, HIROYUKI ADACHI, KOJI YODA, YOICHI NODA (The University of Tokyo)

【背景・目的】

真核細胞の各オルガネラで機能する多くの蛋白質は，ER を出発点とする分泌経路により，目的地に効率よく運ばれていく．ER とゴルジ体間の輸送は初期分泌経路と呼ばれ，ER からゴルジ体への順行輸送を COPII 小胞，逆行輸送を COPI 小胞が担っている．COPII 小胞輸送では，多くの膜貫通型蛋白質（アダプター蛋白質）が積荷の COPII 小胞への選択的な積み込みに機能していることが報告されている．Erv14 は COPII 小胞に多く存在するアダプター蛋白質の 1 つであり，細胞質膜に局在する Axl2 の選択的輸送に機能することが報告されている．また網羅的解析より，*ERV14* 遺伝子の欠損が Axl2 のみならず，他の様々な蛋白質の ER への蓄積を引き起こすことが報告されている．

以前我々は，*ERV14* の欠損により GPI アンカー蛋白質である Gas1 が ER に蓄積することを報告した（藤井ら，2014 年度本大会）．しかし，この 2 つの蛋白質には直接的な結合が観察されなかったため，仲介する蛋白質が存在すると予想した．Gas1 の ER からの選択的輸送には Erv25 を含む p24 ファミリー蛋白質複合体がアダプター蛋白質として機能する．本研究では，Δ*erv14* による Gas1 の輸送の遅延の原因を解明することを目的とし，Erv14 と Erv25 の相互作用が観察されたことを報告する．

【結果】

まず，Δ*erv14* 株を用いてショ糖密度勾配遠心による分画を行った．Δ*erv14* 株では，野生型株と比べて Erv25 の分布がゴルジ体蛋白質を多く含む画分にシフトすることを見出した．またΔ*erv14* 株に *ERV14* をプラスミドで導入することで，Erv25 の分布は回復した．次に，3HA-Erv14 を発現する株と ER に蓄積するような変異を入れた 3HA-Erv14（IFRTL97-101AAAAA）を発現する株を用いて抗 HA 抗体による免疫沈降を行ったところ，Erv25 が 3HA-Erv14 と共免疫沈降し，変異でその量が減少することを見出した．選択的輸送における蛋白質の結合と解離の制御にはオルガネラごとの pH が影響する可能性が示唆されており，分泌経路を進むにつれて基本的に pH は低くなる．3HA-Erv14 を発現する株を用いて pH の異なる Buffer で免疫沈降を行ったところ，低 pH の Buffer でより多くの Erv25 が共免疫沈降した．すなわち，Erv14 は Erv25 と ER より後，おそらくゴルジ体でより強く相互作用することにより Erv25 の逆行輸送に関与し，Δ*erv14* では，Erv25 の ER へのリサイクルの不全により Gas1 の輸送が遅延することが示唆された．

yeast, vesicle transport, GPI-anchor protein

講演番号：2C20p05
講演日時：3 月 18 日 15:00～ C 校舎 20 会場

# 分裂酵母の胞子細胞膜形成における Sec2 の働き

# The role of Sec2 in fission yeast during sporemembrane formation

○畑中 彩花、今田 一姫、中村 太郎（大阪市大院理）
○Sayaka HATANAKA, Kazuki IMADA, Taro NAKAMAURA (Osaka City Univ.)

背景と目的

分裂酵母は栄養源が枯渇すると接合し、二倍体となり減数分裂を行う。その後、4 つの胞子を形成する。胞子形成の際、胞子を包む膜である胞子細胞膜が形成されるが、この時、働くと考えられているタンパク質の 1 つが Sec2 である。Sec2 は全ての真核生物に保存されているタンパク質である。出芽酵母において、Sec2 は膜小胞輸送に中心的な役割を果たす低分子量 GTPase Rab ファミリータンパク質 Ypt31/Ypt32(分裂酵母では Ypt3)のエフェクターかつ下流 Rab タンパク質 Sec4(分裂酵母では Ypt2)のグアニンヌクレオチド交換因子(GEF)として働く。この Sec2 を介する 2 つの Rab タンパクの活性化は Rab カスケードと呼ばれ、膜小胞輸送において極めて重要である。我々は最近、分裂酵母の胞子細胞膜形成における Ypt3, Ypt2 の重要な働きを解明した。本研究の目的は、Sec2 の胞子細胞膜形成における役割を明らかにすることである。

胞子細胞膜は動物細胞において中心体にあたる構造であるスピンドル極体(SPB)の周辺を起点として、ゴルジ体や細胞膜から運搬されてきた膜小胞が融合することで形成される。この膜小胞の融合は動物細胞の繊毛膜の形成と非常に類似しており、興味深い分野である。

結果

Sec2 に GFP を融合させ、胞子形成時の局在を観察したところ、細胞内に多数のドットとして観察されたが、ドットのいくつかは減数分裂が進行したスピンドル微小管の先端に蓄積していることが確認された。このことより、Sec2 が SPB に局在することが示唆された。また、この局在は ypt3 変異株では見られなかったことから、Sec2 の SPB への局在は Ypt3 に依存的であることが明らかとなった。

*sec2*は生育に必須な遺伝子であるため、現在 sec2 に部分的に変異を導入した変異株を取得し、観察することを試みている。

fission yeast, secretory vesicle, Rab protein

講演番号：2C20p06
講演日時：3 月 18 日 15:25～ C 校舎 20 会場

# 分裂酵母の核サイズ制御機構
# Nuclear size control in fission yeast

○久米 一規（広島大先端研）
○Kazunori KUME (Hiroshima Univ.)

膜で覆われたオルガネラである核は、異なる生物種により、大小様々な核サイズをとることが知られているが、核サイズ制御機構については不明な点が多い。これまでに出芽・分裂の両酵母の研究から、核サイズは、細胞サイズに比例して増加し、核サイズと細胞サイズの体積比率（N/C ratio：a ratio between nuclear volume and cellular volume）は、細胞周期を通して、一定に保たれていることが明らかとなった[1, 2]。さらに、興味深いことに、分裂酵母の核サイズは、自身の細胞のもつＤＮＡ含量に依存せず、様々な細胞サイズ変異体において、野生株とほぼ同じＮ／Ｃ　ｒａｔｉｏを示すことがわかった[1]。しかしながら、細胞がいかにして核サイズを決定し、そのサイズを制御しているかについては未だ不明である。

そこで、その手がかりを得るために、これまでに分裂酵母の非必須遺伝子破壊株（約３０００株）を用い、細胞核サイズ（N/C ratio）に異常を示す変異体のスクリーニングを行った。そして、核サイズ異常変異体を複数取得し、順次解析を行ってきた。本発表では、これまでの核サイズ変異体の解析から明らかになった、核サイズに影響を及ぼす細胞内プロセスについて議論したい。

１）Neumann，FR，and　Nurse, P, JCB, 12：593 – 600, 2007.
２）Jorgensen，P，et al., MBC，18：3523 – 3532, 2007.

Nuclear size, Nuclear membrane growth, Nucelar cytoplasmic transport

講演番号：2C20p07
講演日時：3 月 18 日 15:40～ C 校舎 20 会場

# 耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* は嫌気条件下でマイトファジーを誘導する

# Mitophagy under anaerobic condition in the themotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*

賀川 翔太、○星田 尚司、赤田 倫治（山口大院・創成科学・化学系）
Shota Kagawa, ○Hisashi HOSHIDA, Rinji Akada (Dept. Appl. Chem., Yamaguchi Univ.)

好気的条件下で ATP を合成するミトコンドリアは，増殖経過や環境に応じて数や形態を変化させている。これまでに *K. marxianus* のミトコンドリアが嫌気条件下で液胞に取り込まれる現象を見出した。そこで，*K. marxianis* では嫌気条件がマイトファジーを誘導していると考え，本研究では嫌気条件とマイトファジーの関連を調べた。

オートファジー関連遺伝子である *ATG8*, *ATG11*, *ATG19*, *ATG32* をそれぞれ破壊した株を作製した。これらの破壊株にミトコンドリア局在シグナルを N 末にもつ yEGFP (NcSu9-yEGFP)を導入し，好気及び嫌気条件で培養した酵母のミトコンドリアを観察した。好気条件ではどの株でも野生型と同様に GFP 蛍光が細胞周辺にドット状に観察された。一方，嫌気条件では *atg11*, *atg19* の各破壊株では野生株に比べて遅れたものの GFP 蛍光が液胞に観察された。これに対して *atg8*, *atg32* の各破壊株では GFP 蛍光が液胞にまで移動しなかった。*ATG8* はマクロオートファジーを含む種々のオートファジーに必須で, *ATG32* はマイトファジーに必須な遺伝子であることから嫌気条件下でマイトファジーが誘導されていると考えられた。また，*atg8*, *atg32* 破壊株を電子顕微鏡で観察すると，嫌気条件下で培養したそれぞれの破壊株において液胞外に電子密度が高い場所が見られた。NcSu9-yEGFP の観察結果と合わせると液胞に到達できなくなったミトコンドリアと考えられた。液胞で働くタンパク質分解酵素である *pep4* 破壊株では液胞内に膜で囲まれたミトコンドリアが多く見られた。これらのことより嫌気条件下でミトコンドリアはマイトファジーにより液胞に取り込まれ，分解されていると考えられる。

嫌気条件下でマイトファジーが特異的に生じているかを調べるために液胞内で活性型になる Pho8 の活性を指標に定量的に解析した。*PHO8* を破壊した株を作製し，この破壊株にミトコンドリア局在型 Pho8 と細胞質局在型 Pho8 をそれぞれ発現させ，好気及び嫌気条件と窒素飢餓培地(SD-N)及び栄養培地(SD)で培養した酵母の Pho8 タンパク質の活性を測定した。窒素飢餓培地では細胞質局在型 Pho8 の活性が栄養培地(SD)と比べて高かったが，ミトコンドリア局在型は活性化されなかった。一方で，嫌気条件下ではミトコンドリア局在型 Pho8 と細胞質型 Pho8 の活性が好気条件下に比べて高かった。この事から嫌気条件下ではオートファジーも生じるがマイトファジーが誘導されていることが分かった。

mitophagy, anaerobic condition, *Kluyveromyces marxianus*

発表責任者：星田尚司（hoshida@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：2C20p08
講演日時：3 月 18 日 15:55～ C 校舎 20 会場

細菌による多糖輸送：アルギン酸取り込み細菌と分泌細菌の特異な細胞表層構造
Transport of polysaccharide by bacteria: Characteristic cell-surface structure of alginate-import and -export bacteria
○橋本 渉[1]、村田 幸作[2] ([1]京大院・農、[2]摂南大・理工)
○Wataru Hashimoto[1], Kousaku Murata[2] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Fac. Sci. Eng., Setsunan Univ.)

【背景と目的】アルギン酸は、β-D-マンヌロン酸（M）とα-L-グルロン酸（G）から構成されるヘテロ酸性多糖であり、褐藻類やある種の細菌により合成される。M と G は互いに C-5 位でのエピマー体であり、G が豊富に存在するアルギン酸はカルシウムなどの金属イオンと反応しゲル化する。

アルギン酸資化性細菌 *Sphingomonas* sp. A1 株は、細胞表層に「体腔（孔）」を形成し、そこからアルギン酸を多糖のまま細胞内に取り込む。これまでに、透過型電子顕微鏡（TEM）を用いて、減圧条件下の細胞の「体腔」形成を解析してきたが、生細胞での「体腔」形成は不明である。

アルギン酸合成細菌 *Azotobacter vinelandii* が、細胞表層でアルギン酸を「膜小胞」に内包し、細胞から遊離させることによりアルギン酸を分泌することを TEM 解析により見出している。

本研究では、細菌における多糖の輸送機構を明らかにするため、アルギン酸の取り込みや分泌を行う細菌の特異な細胞表層構造を解析した。

【方法と結果】A1 株は細胞表層に「体腔」を形成させる際、膜構造を細胞質側へ陥入させる。そこで、A1 株の細胞表層構造を走査型電子顕微鏡（SEM）により解析した結果、アルギン酸カルシウムゲルに接着した A1 株細胞に、表層構造が窪んだ「体腔」の形成が認められた。また、原子間力顕微鏡（AFM）を用いて、A1 株の生細胞に対して、「体腔」形成を解析した。その結果、生細胞においても「体腔」が形成されることを確認し、その窪みの深さが 76～147 nm 程度であることが分かった。また、「体腔」形成部位は、その周囲と比較すると高電位であった。

SEM 解析により、*A. vinelandii* の菌体表面に細かい「シワ」のような凹凸構造が見られた。この特異な細胞表層構造について、細胞切片を用いた TEM 解析を行った。その結果、細胞表層には微細な凹凸構造が認められ、SEM 画像の特徴とよく一致した。また、SEM 解析により、細胞表層に球状の「膜小胞」の存在が確認された。そのサイズを計測したところ、「膜小胞」は約 40 ナノメートルの球状であった。さらに、「膜小胞」が連結して細胞表層から遊離している細胞や「膜小胞」が融合して繊維状の構造体が細胞表層から遊離している細胞が観察された。

【考察】A1 株細胞は、負電荷のアルギン酸を正に帯電した「体腔」に濃縮し、濃縮したアルギン酸を細胞内に取り込むことが示唆された。一方、*A. vinelandii* は、微小な「膜小胞」にアルギン酸をパッキングすることが分かった。アルギン酸は金属イオンをキレートすることにより密な構造をとることができるため、「膜小胞」でのアルギン酸は同様の構造を示すと考えられる。

alginate, cell surface, bacteria

発表責任者：橋本　渉（whasimot@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2C20p09
講演日時：3 月 18 日 16:10～ C 校舎 20 会場

# Analysis of a protein secretion mechanism via the membrane vesicle production of a cold-adapted bacterium, Shewanella sp. HM13

○Chen CHEN[1], Soichiro KAWAI[1], Jun KAWAMOTO[1], Tomoya IMAI[2], Tatsuo KURIHARA[1]
([1]Institute for Chemical Research, Kyoto University, [2]Research Institute for Sustainable Humanosphere, Kyoto University)

**[Purpose]** Protein expression at low temperatures is expected to alleviate the heat denaturation of proteins and would be suitable for the production of thermolabile proteins. To develop an efficient protein-production and secretion system, we isolated a cold-adapted bacterium, *Shewanella* sp. HM13, from the intestine of a horse mackerel. This strain can secrete a large amount of a protein of unknown function at low temperatures, which is included in the membrane vesicle (MV) fraction of the culture supernatant. In this study, we attempted to elucidate the protein secretion mechanism via the vesiculation of this strain.

**[Method]** *Shewanella* sp. HM13 was grown at 4 ˚C, and the culture supernatant was obtained by centrifugation and applied to SDS-PAGE to analyze secreted proteins. MVs were recovered from the culture supernatant by ultracentrifugation and purified by sucrose density gradient centrifugation. Purified MVs were visualized by transmission electron microscopy (TEM). Size distribution of the MVs was measured by dynamic light scattering (DLS). Phospholipids composition and fatty acid composition of the MVs were measured by ESI-MS and GC-MS, respectively. Gene disruption mutant was generated by homologous recombination with pKNOCK plasmid. MV production of the mutant and the wild-type strain was analyzed by using a lipophilic fluorescence dye, FM4-64.

**[Results and Discussion]** *Shewanella* sp. HM13 abundantly produced a secreted protein (≈41kDa, 0.15 mg/ml, named P41) in the culture supernatant. We also found that *Shewanella* sp. HM13 synthesized MVs, and the diameter of the MVs was about 100 nm according to DLS. To analyze the localization of P41, the culture supernatant was subjected to sucrose density gradient centrifugation. More than 80% of P41 was recovered in the MV-containing fraction. The compositions of phospholipids and fatty acids in the MVs showed little difference from those of the cells. Whole genome sequencing of *Shewanella* sp. HM13 demonstrated that the gene coding for P41 was located in a gene cluster containing *pulD* encoding a component of a general secretory pathway. To analyze the physiological function of P41 and PulD in the MV production, each of these genes were disrupted, and MV production of the mutants was examined. The MV production was not significantly affected by the gene disruption, but the secretion of P41 within the MVs was decreased in the *pul*D-disrupted mutant. These results suggest that PulD is involved in the insertion of P41 into the MVs of this strain, and the P41 secretion machinery is dispensable for the production of the MVs.

Shewanella, Membrane vesicle, Protein secretion

講演番号：2C20p10
講演日時：3 月 18 日 16:25～ C 校舎 20 会場

*Paracoccus denitrificans* においてプロファージ遺伝子 *lys* はストレス条件下での MV 産生に必要である

Prophage gene *lys* is required for MV production under stress condition in *Paracoccus denitrificans*

○安田 まり奈[1]、豊福 雅典[2]、森永 花菜[3]、尾花 望[2]、野村 暢彦[2] ([1]筑波大生命環境、[2]筑波大生命環境系、[3]筑波大院生命環境科学)

○Marina Yasuda[1], Masanori Toyofuku[2], Kana Morinaga[3], Nozomu Obana[2], Nobuhiko Nomura[2] ([1]College of Agrobiological Resource Sciences, University of Tsukuba, [2]Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, [3]Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba)

微生物は自身の膜からメンブランベシクル(MV)を生産する。この MV は、核酸・タンパク質・細胞間コミュニケーション物質を含有することからそれらの運搬体として働くとされており、環境に応じて能動的に MV を生産していることが示されている。しかし MV の形成機構に関する知見は少なく、微生物に普遍的な MV 形成機構は未解明である。

先行研究において、*Pseudomonas aeruginosa* の集団中の一部の細胞が形態変化後に破裂すること(explosive cell lysis, ECL)によって MV が形成される様子が観察された(1)。ECL を介した MV 生産はストレス条件下によって誘導され、また、ストレス条件下における MV 生産誘導にはそれぞれ endolysin と holin をコードする *lys* と *hol* 遺伝子が必要であることが明らかとなった。*P. aeruginosa* においては、この二つの遺伝子はバクテリオシンを放出する際の溶菌機構に関わる遺伝子であるが、他の微生物においてもこれらの遺伝子の機能的ホモログがプロファージ領域に保存されていることより、*lys* および *hol* 遺伝子による MV 生産機構が微生物間に共通したものである可能性が考えられる。本研究では、土壌脱窒細菌 *Paracoccus denitrificans* を用いてストレス条件下で生産が誘導される MV の生合成機構の詳細を明らかにすることを目的とした。

まず、DNA ダメージの誘導剤であるマイトマイシン C を用いて、DNA ダメージストレス条件下での MV 生産の解析を行った。マイトマイシン C の添加量に応じて MV 生産量の増加が観察されたことから、*P. denitrificans* においてもストレスに応答して MV 生産が誘導されることが示された。次に、MV 形成に関わる遺伝子の同定を行うため、ストレス条件下で生産された MV に含まれる DNA のシークエンス解析を行ったところ、プロファージ遺伝子が豊富に含まれていることが明らかとなった。興味深いことに、本プロファージ遺伝子内には推定 *lys* 遺伝子が含まれていた。*lys* 遺伝子破壊株を作成し MV 生産を解析したところ、*lys* 破壊株ではストレスによる MV 生産誘導が見られなかった。以上より、*P. denitrificans* においてもストレス条件下での MV 産生にはプロファージ遺伝子である *lys* が関与することが明らかとなった。

先に述べたように、多くの微生物のゲノム上には *lys* 遺伝子を含むプロファージ領域が保存されていることから、*lys* 遺伝子を介した MV 形成は微生物に普遍的な機構であると考えられる。

(1) Turnbull, Toyofuku, *et. al. Nat Commun.* (2016)

membrane vesicle, endolysin, prophage

発表責任者：安田まり奈（marinabutterflyrose@gmail.com）

講演番号：2C20p11
講演日時：3 月 18 日 16:50～ C 校舎 20 会場

メンブランベシクルの菌体付着には LPS が関与する
LPS affects cell attachment of membrane vesicles
○諏佐 勇磨、黒沢 正治、豊福 雅典、尾花 望、野村 暢彦（筑波大生命環境）
○Yuma SUSA, Masaharu KUROSAWA, Masanori TOYOHUKU, Nozomu OBANA, Nobuhiko NOMURA (University of Tsukuba)

細菌はメンブランベシクル(MV)と呼ばれる膜小胞を形成する。MV は細胞内に存在する様々な物質を内包しており、MV が周囲の細胞に付着・融合することでそれらの物質を輸送し、様々な相互作用に寄与していると考えられている。例えば、グラム陰性細菌である緑膿菌の MV は、ペプチドグリカン分解酵素や病原因子、緑膿菌において用いられるシグナル物質である PQS、また核酸である DNA・RNA を含み、病原性や遺伝子水平伝播、細胞間コミュニケーションに関与する。MV を介した物質輸送機構には MV の形成、伝播、付着・融合の段階があり、形成メカニズムに関してはいくつかモデルが提唱されているが、付着・融合に関わる因子や詳細なメカニズムは明らかになっていない。これらが明らかになれば、上記のような微生物間、宿主間の相互作用を制御できる可能性がある。グラム陰性細菌の外膜には、菌体や基質への付着因子であるリポ多糖(LPS)が存在し、生体膜に由来する MV には LPS が含まれることが示されている。特に緑膿菌外膜には O 抗原が異なる 2 種類の LPS(A band、B band)が存在し、通常の MV に含まれる LPS はほとんどが B band であることが明らかとなっている。これらの事から、本研究では MV の菌体付着因子として LPS に注目し、LPS が MV の菌体への付着に与える影響を調べることを目的とした。

A band、B band の一方、あるいは両方を欠損した菌株由来の MV を蛍光染色して野生株の菌体液と混合し、洗浄後細胞に残存する蛍光量を付着率とした。その結果、野生株由来の MV と比較して LPS 欠損株由来の MV は細胞への付着率が低下した。特に B band を欠損した MV を用いた場合に顕著に低下した。中性環境下で A band は電気的に中性であるのに対し B band は負に帯電していることから、MV と菌体の付着には LPS の電荷が影響することが示唆された。今後、受容細胞に LPS を欠損した菌体を用いて、LPS が MV と菌体の付着に与える影響をより詳細に解析していく予定である。

membrane vesicles, LPS, Pseudomonas aeruginosa

発表責任者：野村暢彦（nomura.nobuhiko.ge@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：2C20p12
講演日時：3 月 18 日 17:05～ C 校舎 20 会場

ウェルシュ菌の膜小胞を介した宿主免疫応答誘導メカニズムの解析
Mechanism Analysis of host immune response induced by membrane vesicles of Clostridium perfringens

○永山 恭子[1]、尾花 望[2]、中尾 龍馬[3]、泉福 英信[3]、中村 幸治[2]、野村 暢彦[2]([1]筑波大・院・生命環境、[2]筑波大・生命環境系、[3]感染研・細菌一)
○ Kyoko NAGAYAMA[1], Nozomu OBANA[2], Ryoma NAKAO[3], Hidenobu SENPUKU[3], Koji NAKAMURA[2], Nobuhiko NOMURA[2] ([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [3]Dept. Bacteriol., Natl. Inst. Infect. Dis.)

多くの微生物はメンブランベシクル（MV）を生産し、環境中に放出する。MV の大きさは 20～400 nm であり、核酸やタンパク質、毒素などを含有することから様々な物質の輸送体として機能していることが明らかとなってきている。MV はグラム陰性菌でその生産が多く報告されている一方、外膜の存在しないグラム陽性菌における報告は少なく、その詳細な機能や形成メカニズムはほとんど明らかになっていない。グラム陽性偏性嫌気性細菌であるウェルシュ菌（*Clostridium perfringens*）はヒトを含む動物の腸管内に常在し、多くの毒素や細胞外酵素を生産することから食中毒やガス壊疽の原因菌として知られる一方で、腸内細菌悪玉菌の一つとしても知られている。ウェルシュ菌 MV が宿主に与える影響を解析するために、マウスマクロファージ様細胞 J774.1 に添加したところ、IL-6 や TNF-α といった炎症性サイトカインの放出を誘導することが明らかとなった。MV 添加により、マクロファージ様細胞においてグラム陽性菌の細胞壁成分の受容体として知られる Toll-like receptor 2（TLR2）の発現が上昇し、TLR2 阻害剤によって MV 添加時における IL-6 放出量が減少することが明らかとなった。このことから、ウェルシュ菌 MV は TLR2 を介して宿主細胞からの各種炎症性サイトカイン放出を誘導することが示唆された。ウェルシュ菌膜画分を J774.1 に添加したところ、MV 添加時と比較して TNF-α の放出は同程度に誘導した一方で、IL-6 放出量や TLR2 発現量が減少したことから、ウェルシュ菌 MV は膜画分とは異なる炎症性サイトカイン誘導性を示すことも明らかとなった。MV の構成成分を解析したところ、MV は膜画分と比較して細胞壁成分を多く含有していることが明らかとなった。一方で、細胞壁の主成分であるペプチドグリカンをウェルシュ菌から精製し、J774.1 に添加したところ、炎症性サイトカインの放出が見られなかった。このことから、MV の免疫原性には他の細胞壁成分が関与していることが示唆された。さらに、ウェルシュ菌 MV をマウス鼻腔に接種したところ、血中にはウェルシュ菌特異的 IgG 抗体、全身の粘膜面（鼻腔、口腔、腸管）には IgA 抗体が生産誘導されることが明らかとなった。以上のことから、ウェルシュ菌 MV は宿主の自然免疫および獲得免疫を誘導することが明らかとなった。本研究により、腸内細菌ウェルシュ菌の放出する MV は宿主免疫に大きな影響を与えている可能性が示唆された。

Membrane vesicle, Clostridium perfringens, host-bacteria interaction

講演番号：2C20p13
講演日時：3 月 18 日 17:20～ C 校舎 20 会場

# 活性汚泥におけるメンブランベシクルの生産

# Membrane vesicle formations in activated sludge

○鬼澤 里奈、豊福 雅典、森永 花菜、尾花 望、野村 暢彦（筑波大・生命環境）
○Rina ONIZAWA, Masanori TOYOFUKU, Kana MORINAGA, Nozomu OBANA, Nobuhiko NOMURA (Univ. of Tsukuba)

多くの細菌はメンブランベシクル（MV）を産生することが知られている。MV とは主に細胞膜から形成される直径 20～400 nm の球体であり、タンパク質や脂質、核酸、シグナル物質などを含む。MV は遺伝子の水平伝播や微生物間コミュニケーション、宿主との相互作用への寄与等の様々な機能を持つことが示されており、細胞間相互作用において重要な役割を担っていると考えられている。

これまでに報告された MV 研究は単離株を用いた限られた条件下におけるものがほとんどである。その一方で、アメリカ東海岸沖および外洋から採取した海水において MV が豊富に存在するなど（Biller *et al.*、 2014)、実環境中にも多くの MV が存在し、細胞間相互作用に深く関与していることが示唆される。しかしながら、実環境中での MV の存在や機能に関する報告はほとんどなく、その多くが未解明である。そこで、本研究では実環境中における MV 生産菌と MV 受容菌の関係を明らかにすることを目的とした。

微生物が多く存在する環境として活性汚泥を用いた。まず、活性汚泥中に MV が存在するかどうか調べるために、超遠心によって回収した MV 溶液の膜脂質を膜染色剤 FM4-64 によって定量し、電子顕微鏡（TEM）によって微細構造を観察した。その結果、異なる活性汚泥サンプルから MV 様粒子が同定され、活性汚泥中には MV 生産菌が存在することが示唆された。また、汚泥サンプル間で MV 様粒子のサイズ分布に違いが見られたことから、環境間で異なる機能性の MV が存在する可能性が考えられた。今後、MV 生産菌と MV 受容菌の関係を明らかにすることにより、実環境中における MV を介した微生物間ネットワークの解明に繋がることが期待される。

membrane vesicle, polymicrobial system, activated sludge

講演番号：2C20p14
講演日時：3 月 18 日 17:35～ C 校舎 20 会場

好熱性細菌 *Meiothermus ruber* H328 株の *degP* 遺伝子破壊株を用いた膜小胞産生に関する研究
Study of the control of membrane vesicle production by use of a *degP* mutant of *Meiothermus ruber* H328

大西 愛航[1]、清水 歩[1]、西 海斗[1]、川崎 一則[2]、○渡部 邦彦[1] ([1]京都府大院生環、[2]産総研・生命工学)
Manato Onishi[1], Ayumu Shimizu[1], Kaito Nishi[1], Kazunori Kawasaki[2], ○Kunihiko Watanabe[1] ([1]Kyoto Pref. Univ., [2]AIST)

【背景・目的】 好熱性細菌 *Meiothermus ruber* H328 株は、ケラチン分解性プロテアーゼを分泌しトリ羽毛を強力に分解する。その研究過程で、H328 株は、細胞外に脂質二重膜構造を有する、しかし細胞とは異なる膜小胞 (membrane vesicle) を産生することを見出し、ケラチン分解性プロテアーゼがこの膜小胞上にも存在することを免疫電顕観察から確認している [1)]。他方、*Escherichia coli* において、ペリプラズムに局在するシャペロン/プロテアーゼ DegP を欠損した *ΔdegP* 株が、熱ストレス条件下で野生株 (WT) に比べて膜小胞産生が増加したことが報告されている [2)]。細菌に産生される膜小胞は、生理活性物質や酵素タンパク質の新しい天然キャリヤとして今後期待されている。そこで、本研究では H328 株における膜小胞産生のコントロールを目的として、*degP* を同定後、遺伝子破壊株を作成し、熱ストレス条件下における膜小胞産生量の変化について研究を行った。
【方法】 H328 株の *degP* 同定は、*E. coli* の DegP タンパク質を基に、H328 株のゲノム情報 [3)]を用いて相同性の比較から行った。遺伝子破壊株の構築は、耐熱化されたカナマイシン耐性遺伝子を挿入する相同組換えにより行った。膜小胞産生量の比較・定量は、培養上清から細胞等を分離後、超遠心で得られた膜小胞画分に対して、膜脂質染色用蛍光色素 (DiI) を添加・インキュベートし、増加する蛍光強度を測定することで行った。
【結果】 遺伝子破壊株 *ΔdegP* 株は、野生株と異なり 55 °C を超える培養温度では生育に顕著な熱感受性を示すことが判った。加えて、野生株では培養温度変化 (55→60°C) に対して DiI による蛍光強度の変化が見られず、膜小胞産生量の変化なしと判断された。それに対し、60°C で培養した *ΔdegP* 株では、DiI による大きな蛍光強度の増加が見られ、このことは *degP* を欠損したことにより、膜小胞産生量が増加することが示唆された。このことを、実態として確認するため電顕ネガティブ染色法を用いた電子顕微鏡観察を行ったところ、直径 100 nm 以上と数 10 nm の小胞が多数増加していることが確認できた。この結果は、大腸菌の場合と同じく、*degP* により膜小胞産生がコントロールできることを示しているが、サイズの異なる小胞について検討を行っている。
【文献】1) *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 78:1623-1625 (2014); 化学と生物 54:720-725 (2016); *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100:9837–9843 (2016) 2) *J. Bacteriol.* 195: 4161-4173 (2013) 3) *Genome Announcements* 1:e00176-13 (2013)

membrane vesicle, degP, chaperone

発表責任者：渡部邦彦（kwatanab@kpu.ac.jp）

講演番号：2C23a01
講演日時：3 月 18 日 09:20～ C 校舎 23 会場

*Halomonas* sp. KM-1 株による好気培養条件化でのクエン酸の効率的な分泌生産
Efficient production and secretion of citrate from *Halomonas* sp. KM-1 under aerobic conditions
○河田 悦和[1]、盤若 明日香[2]、西村 拓[2]、松下 功[2]、坪田 潤[2]([1]産総研、[2]大阪ガス)
○Yoshikazu Kawata[1], Asuka Hannya[2], Taku Nishimura[2], Isao Matushita[2], Jun Tsubota[2] ([1]AIST, [2]OSAKA GAS Co.)

（概要）我々は好塩好アルカリ・*Halomonas* sp. KM-1 株を用いて、化成品中間体を生産する研究を実施している。KM-1 株は、培養に酵母エキス等を要せず、Ｃ５糖や廃グリセロールを資価し、中程度の高塩濃度、pH9-10 で好適に生育するため、雑菌の混入が生じにくく、大量のエネルギーが必要な培地などの滅菌が不要である。昨年度本大会などで１)、菌体中にバイオプラスチックＰＨＢ合成を促進する過程で、ＰＨＢ合成が抑制され、著量のピルビン酸を分泌することを報告したが、最近さらに、好気的な条件でクエン酸のみを効率的に分泌生産する条件を見出したので報告する。
（方法と結果）炭素源としてグルコース、窒素源として硝酸ナトリウムを用い、37℃で培養し、菌体および培地組成を分析した。従来の条件では、著量のピルビン酸を分泌したが、培養の途上、対数増殖期もしくは培養当初から培地に含まれる塩濃度を 1.0M 程度に上昇させると、ピルビン酸の生産が抑制され、代わりに 100g/L 以上のクエン酸を分泌生産することを見出した。
ハロモナス菌において、クエン酸の生産の報告はなく、また、好気条件かつ好塩・好アルカリ微生物による有機酸の生産は、その生理メカニズムの観点からも興味深いものと思われ、現在その生産メカニズムについて、代謝物の変化も含め検討を行っている。

1) Y. Kawata, T. Nishimura, I. Matsushita and J. Tsubota (2016) Efficient production and secretion of pyruvate from *Halomonas* sp. KM-1 under aerobic conditions. AMB Express, 6: 22.

Halomonas, citrate

発表責任者：河田悦和（y-kawata@aist.go.jp）

講演番号：2C23a02
講演日時：3 月 18 日 09:35～ C 校舎 23 会場

# *Citrobacter braakii* TB-96 株における 1,3-プロパンジオール生産増強のための低有機酸生産株の取得

# Mutation of *Citrobacter braakii* strain TB-96 to improve 1,3-propanediol production by restricting organic acid accumulation

○森田 峻秀、清 啓自、野中 大輔、中島 敏明 (筑波大院生命環境)
○Takahide Morita, Keiji Kiyoshi, Daisuke Nonaka, Toshiaki Nakajima (Univ. Tsukuba)

【背景・目的】

現在、化石燃料の代替エネルギーとしてバイオディーゼル燃料(BDF)が注目されている。しかし、BDF 生産において副生する廃グリセロールは高アルカリ性かつ不純物を含み、再利用が困難であるためコストをかけて処分されている。このため、廃グリセロールの有効利用及び BDF 生産のコスト削減のため、これを基質とした有用物質の発酵生産が注目されている。本研究では、ポリマー原料やアクリル酸の前駆体として利用される 1,3-プロパンジオール(1,3-PD)の廃グリセロールからの生産を目的として検討している。我々はこれまでにグリセロール資化性の 1,3-PD 生産菌 *Citrobacter braakii* TB-96 株を環境中から単離した。TB-96 株は高い 1,3-PD 生産能を有し、純グリセロールから 50.1 g/L の 1,3-PD を 48 時間で生産するが、廃グリセロールを基質とすると 1,3-PD 生産は 30.0 g/L に低下する。一方、副産物である乳酸の生産は純グリセロールでの 19.6 g/L (0.13 mol/mol)から 28.9 g/L (0.33 mol/mol)に著しく高くなる。1,3-PD と乳酸の生産においては炭素源のみでなく、補因子である NADH の競合も生じるため、廃グリセロールからの 1.3-PD 生産量および収率向上には乳酸の副生産低減が重要である。このため、本研究では TB-96 株の 1,3-PD 生産の増強を目的とし、TB-96 株の乳酸生産抑制株の取得を目指した。

【方法・結果】

本研究では人為的突然変異とプロトン自殺法の組み合わせにより TB-96 株を親株とした乳酸低生産・高 1,3-PD 生産菌の取得を試みた。変異源に UV 照射または変異剤(メタンスルホン酸エチル)を用いて突然変異処理し、選択培地を pH 5.5、臭化ナトリウムと臭素酸ナトリウム濃度をそれぞれ 220 mM と 55 mM の時、安定的に変異株の取得が可能であった。これまでに有機酸低生産菌と考えられる変異株の中で、試験管でのバッチ培養において 1,3-PD 生産量は野生株と同等ながら乳酸生産が最大 30%低減した変異株を取得した。現在、当変異株においてファーメンターでのグリセロールの流加培養により発酵能の変化を精査している。また、遺伝子破壊による有機酸低生産株の取得についても検討しており、併せて報告する。本研究は JST, ALCA の一環として行われた。

1,3-propanediol, *Citrobacter braakii*, glycerol

講演番号：2C23a03
講演日時：3 月 18 日 09:50～ C 校舎 23 会場

# オフタルミン酸の新規発酵生産法の確立

# Development of a fermentative production method of ophthalmic acid

○所 真衣子、伊藤 智和、邊見 久、吉村 徹 (名大院生命農)
○Maiko TOKORO, Tomokazu ITO, Hisashi HEMMI, Tohru YOSHIMURA (Nagoya Univ.)

オフタルミン酸はγ-Glu-2-Aminobutyryl(2AB)-Gly からなるトリペプチドで、グルタチオン(γ -Glu-Cys-Gly, GSH)のアナログである。オフタルミン酸は、水晶体のレンズ中や、急性肝障害時の血中に高濃度見出される。また、甘味、塩味、うま味などの基本味を増強させるこく味作用があることなどが報告されている。我々は、*Escherichia coli* のピリドキサール 5'リン酸(PLP)結合タンパク質 YggS の機能解析の過程で、*yggS* 欠損株(Δ*yggS* 株)が高濃度のオフタルミン酸を蓄積することを見出し、これを用いたオフタルミン酸の新規発酵生産法について検討している。現在までに、Δ*yggS* 株におけるオフタルミン酸分解酵素(γ-グルタミルトランスフェラーゼ, GGT)の欠損、合成酵素(γ-グルタミルシステイン合成酵素, GshA、およびグルタチオン合成酵素, GshB)の共発現がオフタルミン酸の発酵生産に効果的であることが示されている。

Δ*yggS* Δ*ggt* 株に *gshA* および *gshB* を共発現させた株では、オフタルミン酸生産量が野生株と比べ 130 倍上昇したものの、オフタルミン酸生産量は 20 μmol/L 程度で頭打ちとなった。そこで GshA にフィードバック阻害脱感作変異を導入(*gshA**)したところ、上記変異を有する株では、アミノ酸添加に対応したオフタルミン酸生産量の増加が認められた。1.0 mM の L-Glu、L-2-AB、Gly 存在下でのオフタルミン酸生産量は変異導入前と比べ約 10 倍上昇した。次に、オフタルミン酸の菌体外への更なる蓄積を目的とし、推定オフタルミン酸インポーター(*yliABCD*)の欠損株(Δ*yliAB* 株)を作製した。*gshA** および *gshB* を共発現した三重欠損株(Δ*yggS* Δ*ggt* Δ*yliAB* 株)のオフタルミン酸生産量は親株と同程度だった。本研究ではまた、培地組成の最適化について検証した。2.5 mM の L-Glu、L-2-AB、Gly 存在下で *gshA** および *gshB* を共発現するΔ*yggS* Δ*ggt* 株は、24 時間以内に 377 μmol/L(108 mg/L)のオフタルミン酸を培地中の主要なアミノ酸として生産した。

ophthalmic acid, glutathione

講演番号：2C23a04
講演日時：3 月 18 日 10:05～ C 校舎 23 会場

# アミノ酸置換による 2-deoxy-scyllo-inososе（DOI）合成酵素活性の強化

# Enhancement of 2-deoxy-scyllo-inosose (DOI) synthase activity by amino acid substitution

○鈴木 涼子[1]、山﨑 晴丈[1]、伏信 進矢[2]、高久 洋暁[1] ([1]新潟薬大・応生科、[2]東大院農)
○RYOKO SUZUKI[1], HARUTAKE YAMAZAKI[1], SHINYA HUSHINOBU[2], HIROAKI TAKAKU[1] ([1]Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [2]Tokyo Univ.)

【目的】現在、化学製品は主として石油などの化石資源から生産され、我々の生活を支えている。しかし、その生産法は地球温暖化や化石資源の枯渇などの問題を抱える。この問題の解決策として、これまでのオイルリファイナリーからバイオマスを原料として製品を製造するバイオリファイナリーへのパラダイムシフトが望まれている。本研究室では、カテコール、ハイドロキノンなどの 2 価フェノールに簡単に化学合成変換可能な有用化学工業原料前駆体 2-デオキシ-シロ-イノソース(DOI)を、グルコース代謝工学的改変を施した大腸菌に DOI 合成酵素をコードする *btrC* 遺伝子を導入することで、グルコースからほぼ 100%の効率で発酵生産できる組換え大腸菌を開発した。DOI はグルコース-6-リン酸（G6P)を基質として、DOI 合成酵素（DOIS)、補酵素 $NAD^+$存在下で合成される。組換え大腸菌内でグルコースから DOI を短時間で効率よく生産させるためには、DOIS 活性を向上させ、G6P から DOI への変換速度の上昇が必要だと考えられる。そこで本研究では、ホモ 2 量体構造（Chain A と Chain B）を有する DOIS の X 線結晶構造解析結果に注目し、DOIS に変異を導入することで、高活性型 DOI 合成酵素を取得することを目的とした。
【方法および結果】DOIS の基質である G6P と直接相互作用しているアミノ酸残基の 141 番目のリシンや 243 番目のグルタミン酸への変異導入は、DOIS 活性の低下を引き起こすことが報告されている。そこで活性中心近傍に存在し、活性部位への G6P の取り込みに関与すると予想されているゲートキーピングループのアミノ酸残基(320-326 番目)を標的改変部位候補とした。さらに chainB の活性中心近傍には、chainA の 94 番目のアルギニンと 118 番目のフェニルアラニンも存在することから、この二つのアミノ酸残基も標的改変候補に加えた。それぞれのアミノ酸残基をアラニンに置換する変異型 DOI 合成酵素遺伝子を作製し、大腸菌へ導入した。組換え大腸菌から変異型 DOI 合成酵素を精製後、*in vitro* DOI 合成酵素活性測定系で評価を行った。その結果、G6P と直接作用する 322 番目のアミノ酸残基置換は活性が消失した。118 番目のアミノ酸残基置換は、大腸菌内で蛋白質の凝集を引き起こし、精製ができなかった。その他のアミノ酸残基置換は、DOI 合成酵素活性の低下又は向上を見せたことから、これらのアミノ酸残基改変は DOI 合成酵素活性を変化させる効果的なアミノ酸残基であると考えられた。現在、これらの標的アミノ酸が酸性アミノ酸なら酸性強度の異なる他の酸性アミノ酸、塩基性アミノ酸なら塩基性強度の異なる他の塩基性アミノ酸に置換するなどして、DOI 合成酵素活性を大きく向上させる効果的なアミノ酸置換を探索している。

2-deoxy-scyllo-inosose, btrC, amino acid substitution

発表責任者：高久洋暁（htakaku@nupals.ac.jp）

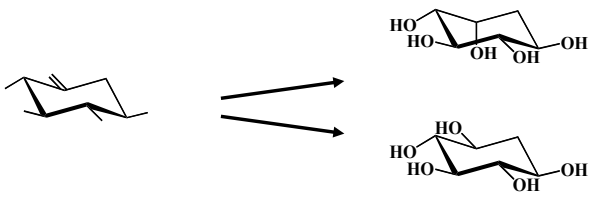
講演番号：2C23a05
講演日時：3 月 18 日 10:20～ C 校舎 23 会場

# 組換え大腸菌による糖からの(-)-*vibo*-quercitol の高発酵生産

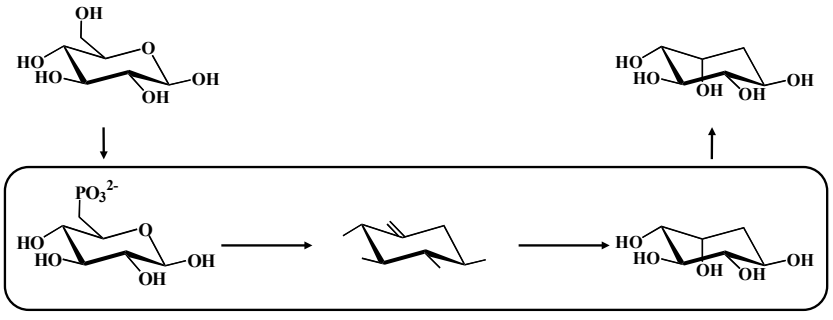
# Efficient production of (-)-*vibo*-quercitol from glucose in recombinant *Escherichia coli*

○荒 学志、川崎 優気、山崎 晴丈、高久 洋暁（新潟薬大）
○Satoshi ARA, Yuuki KAWASAKI, Harutake YAMAZAKI, Hiroaki TAKAKU (Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci.)

【目的】近年、希少な inositol 類縁体において有用な生理活性が見出されており、その一部はアルツハイマー治療薬や糖尿病治療薬、多嚢胞卵巣症治療薬としての実用化が進められている。本研究室は inositol 類縁体の合成前駆体として利用可能な 2-deoxy-*scyllo*-inosose (DOI) を、グルコースを原料として組換え大腸菌に大量に生産させる技術を有している。前大会では DOI を資化し有用 inositol 類縁体へ変換することのできる酵母の探索を行い、その中から DOI を還元し(-)-*vibo*-quercitol と *scyllo*-quercitol へと変換することのできる酵母 *Cryptococcus podzolicus* ND-1 株の単離と DOI 還元酵素 (DOIR) の特性解析について報告した。(-)-*vibo*-quercitol はマウス実験において血糖降下作用を示す報告があることから糖尿病治療薬・予防薬としての利用が期待できる。そこで本大会では DOI 合成酵素 (BtrC) と DOIR を発現させた組換え大腸菌を用いた糖からの(-)-*vibo*-quercitol 発酵生産系の構築について報告する。



【方法・結果】昨年度大会において、DOI 資化酵母 *C. podzolicus* ND-1 株から DOIR をコードする完全長 cDNA 配列のクローニング、精製組換え DOIR の DOI から(-)-*vibo*-quercitol への変換活性について報告した。本研究では、DOIR の cDNA を本研究室の有する恒常性高発現プロモーターである改変型 gadA プロモーターの下流に連結させ、DOIR 発現カセットを構築した。同様にして DOI 合成酵素である BtrC 発現カセットを構築し、二つの発現カセットを pBR322 プラスミドに連結させ(-)-*vibo*-quercitol 生産用プラスミドを作製した。作製したプラスミドを DOI 合成酵素基質グルコース-6-リン酸を高蓄積する DOI 高生産宿主大腸菌 GI724ΔPZP 株に導入し、3% グルコース、4% マンニトールを加えた 2 x YT 培地を用いて 30ºC の条件で培養を行った。培養上清液をトリメチルシリル誘導体化し、GCMS を用いて解析を行ったところ、DOI はほとんど検出できなかったが、(-)-*vibo*-quercitol を検出した。この時のグルコースから (-)-*vibo*-quercitol への変換効率はほぼ 100%であった。遺伝子組換え大腸菌によるグルコースからの (-)-*vibo*-quercitol への高効率変換系の構築に成功した。現在 (-)-*vibo*-quercitol の生産速度と培養液中の蓄積量を向上させるための培養条件の検討を行っている。



(-)-*vibo*-quercitol, 2-deoxy-*scyllo*-inosose, *Escherichia coli*

発表責任者：高久 洋暁（htakaku@nupals.ac.jp）

講演番号：2C23a06
講演日時：3 月 18 日 10:45～ C 校舎 23 会場

# 還元力高産生コリネ型細菌によるペントース-リン酸経路非依存バリン発酵

# Valine production independent of the oxidative pentose phosphate pathway by *Corynebacterium glutamicum* with *Streptococcus mutans* -type redox metabolism

○堀 一将[1]、田中 利果[1]、林 幹朗[2]、竹野 誠記[1]、池田 正人[1]([1]信州大農・応生科、[2]協和発酵バイオ)

○Kazumasa HORI[1], Rika TANAKA[1], Mikiro HAYASHI[2], Seiki TAKENO[1], Masato IKEDA[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Kyowa Hakko Bio)

ミュータンス菌（*Streptococcus mutans*）はコリネ菌（*Corynebacterium glutamicum*）と異なり、ペントース-リン酸経路で NADPH を産生できない。その代わりに、解糖系で NADPH を産生できる。ペントース-リン酸経路では脱炭酸による炭素ロスが発生するので、それを回避できるミュータンス菌のレドックス代謝系は理想的である。それを可能にしているのは、同菌の持つ特異な NADP 型グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GapN）である。我々は、その GapN で解糖を行うことができるコリネ菌、RE2A$^{iol}$ 株を開発した。この菌株は、自前の NAD 型グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GapA）を発酵の初期だけ補助的に発現させられるシステムも兼ね備えている。これまで、各種発酵でその有用性の検証を進めており、既にリジン発酵においては、RE2A$^{iol}$ 株が高い発酵性能を持つこと、そして、その高い発酵性能が狙い通りに宿主の還元力高産生能によることを、細胞内の NADPH/NADP$^+$比を測定することで確かめている [1, 2)]。今回、同宿主に、脱感作型アセトヒドロキシ酸シンターゼ（AHAS）を発現するプラスミドを導入してバリン生産菌を育種し、そのバリン生産能を対照株（GapA 株）と比較した。グルコースを炭素源とするフラスコ培養で、対照株のバリン生産量が 20 mM であるのに対し、RE2A$^{iol}$ 株はその約 2 倍の生産量を示した。両株からグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 *zwf* を破壊してペントース-リン酸経路を遮断すると、対照株ではバリン力価が半減したのに対し、RE2A$^{iol}$ 株では高いまま維持されていた。すなわち、解糖系で還元力を産生する RE2A$^{iol}$ 株の細胞内は、ペントース-リン酸経路の代謝の有無に関わらず、対照株に比べて高い還元状態にあり、これがペントース-リン酸経路に依存しないバリン発酵を可能にしていると考えられる。

1) Appl Environ Microbiol **76:**7154-7160 (2010)
2) Metab Eng **37:**1-10 (2016)

*Corynebacterium glutamicum*, Valine production, Nonphosphorylating NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

発表責任者：池田正人（m_ikeda@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2C23a07
講演日時：3 月 18 日 11:00～ C 校舎 23 会場

# コリネ型細菌における新規脂肪酸増産変異

# A novel mutation relevant to fatty acid production in *Corynebacterium glutamicum*

○村田 紀子[1]、内藏 萌[1]、林 幹朗[2]、竹野 誠記[1]、池田 正人[1]([1]信州大農・応生科、[2]協和発酵バイオ)

○ Noriko MURATA[1], Moe KURA[1], Mikiro HAYASHI[2], Seiki TAKENO[1], Masato IKEDA[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Kyowa Hakko Bio)

これまでに、コリネ菌（*Corynebacterium glutamicum*）の野生株において、脂肪酸生合成のリプレッサー遺伝子 *fasR* の欠損が脂肪酸の分泌を引き起こすこと、この *fasR* 欠損株（PAS-15）から自然変異をさらに二段階積み重ねることでオレイン酸の分泌量が段階的に高まった 3 点変異株（PCC-6）を得たこと、さらに、その増産変異はいずれも脂肪酸合成酵素 FasA の強化に関わる変異であることを明らかにしてきた[1)]。一方、我々は最近、PAS-15 株から別ラインで育種を行い、遺伝的背景の異なる生産菌の分離を試みた。得られた有望株のゲノムを解析した結果、その内の一株にこれまでと異なる新規変異を見いだした。ミコール酸合成に関わるアセチル-CoA カルボキシラーゼ（*accD3* ）のミスセンス変異（A433T）である。PAS-15 株で同遺伝子を破壊すると、オレイン酸分泌量は増加するものの生育が悪化したことから、同変異は正常な生育とオレイン酸増産を両立させる弱化変異と推察される。コリネ菌が細胞壁に特異的にもつミコール酸はオレイン酸等の脂肪酸を基質として合成されることから、オレイン酸分泌量の増加は、同変異でミコール酸合成能が制限され、その分の炭素がオレイン酸分泌に回ったためと考察される。本変異をオレイン酸高生産菌 PCC-6 株に導入すると、Glc 1%の培養でオレイン酸の分泌量は約 200 mg/L から約 250 mg/L に向上した。

1) Appl Environ Microbiol **79**:6776 -6783 (2013)

*Corynebacterium glutamicum*, Fatty acid production, Mycolic acid

発表責任者：池田正人（m_ikeda@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2C23a08
講演日時：3 月 18 日 11:15～ C 校舎 23 会場

# ピメリン酸バイオアッセイ用に開発した指示菌 BioF-4 株の特性解析
# Characterization of the indicator strain BioF-4 for pimelic acid bioassay

○川上 春佳[1]、加藤 峻介[1]、林 幹朗[2]、竹野 誠記[1]、池田 正人[1]（[1]信州大農・応生科、[2]協和発酵バイオ）
○Haruka KAWAKAMI[1], Ryosuke KATO[1], Mikiro HAYASHI[2], Seiki TAKENO[1], Masato IKEDA[1]
([1]Shinshu Univ., [2]Kyowa Hakko Bio)

前大会で、ピメリン酸（ビオチン合成の前駆体である中鎖ジカルボン酸）を簡便に検出するためのバイオアッセイ系を開発したことを報告した。指示菌は、大腸菌 *bioF* を導入したコリネ菌 BioF-1 株から 3 段階で育種したピメリン酸低濃度要求株 BioF-4 である。その親株である BioF-1 株のピメリン酸要求量が 10 g/L と極めて高いのに対し、BioF-4 株のそれは 0.1 mg/L と、要求量は 4 桁少ない。この高感度な指示菌の開発により、ピメリン酸を 1 mg/L のオーダーまで定量することが可能になった。今回、本指示菌の持つ変異点を特定し、それに基づいてピメリン酸要求量の低下をもたらす遺伝的背景を解析した結果、少なくとも 2 つの仕組みが関わっていることが示唆された。1 つはピメリン酸の CoA 化を担うと推定される遺伝子の高発現化、もう 1 つはピメロイル-CoA の脱 CoA 化に関わると推定される遺伝子の欠損である。その両者が協調してピメリン酸からピメロイル-CoA への転換を高め、ひいてはピメリン酸の効率的利用に繋がっていると考えられる。因みに、いずれの遺伝子産物もピメリン酸との関連は知られていない。

*Corynebacterium glutamicum*, Pimelic acid, Bioassay

発表責任者：池田正人（m_ikeda@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2C23a09
講演日時：3 月 18 日 11:30～ C 校舎 23 会場

# コリネ型細菌の持つ 2 種の I 型脂肪酸合成酵素のリポ酸合成への関与

# Role of two type I fatty acid synthases in α-lipoic acid biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*

○中村 絵梨[1]、長島 尭[1]、林 幹朗[2]、竹野 誠記[1]、池田 正人[1]([1]信州大農・応生科、[2]協和発酵バイオ)

○ Eri NAKAMURA[1], Takashi NAGASHIMA[1], Mikiro HAYASHI[2], Seiki TAKENO[1], Masato IKEDA[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Kyowa Hakko Bio)

コリネ菌（*Corynebacterium glutamicum*）はリポ酸を自らデノボ合成できるが、その基質である C8 の中鎖脂肪酸（オクタン酸）がどのように供給されるのかは不明である。その候補となる脂肪酸合成酵素（FAS）には I 型と II 型の二つのタイプがある。大腸菌や枯草菌など細菌は複数の触媒反応が別々の酵素に担われる II 型 FAS を有し、これがオクタン酸供給に関わるというのが定説である。一方、真核生物は巨大な多機能酵素である I 型 FAS を有するが、ミトコンドリアに II 型 FAS も有し、この II 型がオクタン酸供給に関わっていることが最近の研究で明らかにされつつある。つまり、生物界全般でオクタン酸供給に I 型 FAS の関与は知られていない。コリネ菌は例外として II 型 FAS は有しておらず、真核型の I 型 FAS を 2 種有する（FasA & FasB）。FasA は細胞膜の主成分であるオレイン酸の合成に、一方、FasB は細胞表層のミコール酸の主成分であるパルミチン酸の合成に関わるが、パルミチン酸は FasA によっても合成されるため、FasB は余剰機能と考えられている。実際、*fasB* 破壊株は表現型が出ないとの報告がある（Radmacher et al. Microbiology **151**:2421-2427, 2005）。今回、我々は FasB がリポ酸合成という重要な役割を担うことを見いだした。菌体を希釈して最少寒天培地にモノコロニーになるように塗布すると *fasB* 破壊株は明確なリポ酸の要求性を示し、同要求性は、リポ酸の前駆体であるオクタン酸（C8 の中鎖脂肪酸）でも回復した。一方、*fasA* 破壊株はリポ酸やオクタン酸の要求性を示さず、FasB が特異的にオクタン酸合成に関与することが示された。

*Corynebacterium glutamicum*, α-lipoic acid biosynthesis, Type I fatty acid synthase

発表責任者：池田正人（m_ikeda@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2C23a10
講演日時：3 月 18 日 11:45～ C 校舎 23 会場

# 油脂（triacylglycerol）を分泌する酵母の解析

Characterization of yeasts secreting lipids (triacylglycerol)

○村川 直美、松崎 浩明、秦野 琢之（福山大生命工）
○Naomi MURAKAWA, Hiroaki MATSUZAKI, Takushi HATANO (Fukuyama Univ.)

【目的】油脂生産微生物のほとんどは産物油脂を細胞内に蓄積するため、細胞内に油脂が満たされると生合成は低下しかつ産物の回収には菌体の破砕が必須となる。我々は、油脂を細胞外へ分泌生産する微生物を育種したい。産物油脂を細胞外に排出させることにより、生産能の強化と抽出コストの削減を目指している。これまで 2 種の酵母（*Trichosporon* sp.および *Saccharomyces cerevisiae*）の triacylglcerol（TG）分泌変異株を材料として、TG の細胞外排出機構の解析を行ってきた。

【方法･結果】*S. cerevisiae* の STG1 変異株は、TG を菌体外に漏出する。STG1 株の TG 分泌（$Halo^{+}$：TG 分泌株のコロニー周辺へのテスター株のマイクロコロニー形成）形質は 1 遺伝子変異に由来し、野生型遺伝子により相補される。また細胞凝集性が強く、遺伝子クローニングの障壁ともなってきた。変異遺伝子を特定するため、Yeast-Knock-Out collection（YKO、約 4800 株）より TG 分泌の表現型を示す株をスクリーニングした。得られた候補株について、STG1 株との相補試験並びに菌体外 TG の検出を行った。その結果、候補遺伝子は 3 つに絞られた。親株（YP1）の候補遺伝子をそれぞれ破壊したところ、菌体外に TG が検出されるようになった。候補遺伝子の塩基配列を親株のそれとそれぞれ比較した結果、いずれの候補遺伝子も ORF の上流数百塩基から下流数百塩基までに変異点は存在しなかった。STG1 株の微小管や核を観察すると *spc72Δ*株と同様の形質を有していた。そこで *spc72* 遺伝子の RT-PCR を行い発現の有無や強弱を確認したが、どちらの株でも発現しており、有意差は認められなかった。また油滴を形成するタンパクを解析した結果、親株と STG 株とで分子種に変動が認められた。今後、これらのタンパク分子種と SPC72 タンパクとの関係を調べる予定である。

一方、これまでの知見をもとに、*S. cerevisiae* 以外の酵母で TG 分泌が可能であるかを確認することとした。全ゲノム配列が同定されている油脂酵母の *Kluyveromyses lactis* と *Yarrowia lipolytica* を材料に用いて、*S. cerevisiae* の TG 分泌の表現型を示す遺伝子とのオルソログ遺伝子を破壊することで、TG 分泌型酵母を取得することを検討している。

triacylglycerol, secretion, yeast

発表責任者：秦野琢之（hatano@bt.fubt.fukuyama-u.ac.jp）

講演番号：2C23p01
講演日時：3 月 18 日 14:00～ C 校舎 23 会場

# 油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の油脂高蓄積変異株の取得と油脂合成・分解関連重要遺伝子の同定

# Isolation of oleaginous yeast *Lipomyces starkryi* mutants with high lipid accumulation and identification of important genes for lipid synthesis and degradation

○小林 鈴花[1]、海老名 沙也佳[1]、阿部 史歩[1]、山崎 晴丈[1]、志田 洋介[2]、小笠原 渉[2]、高久 洋暁[1]([1]新潟薬大・応生科、[2]長岡技科大・工)
○Suzuka KOBAYASHI[1], Sayaka EBINA[1], Shiho ABE[1], Harutake YAMAZAKI[1], Yosuke SHIDA[2], Wataru OGASAWARA[2], Hiroaki TAKAKU[1] ([1]Fac. Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [2]Nagaoka Univ. Technol.)

近年、世界の油脂需要は、急激な人口増加によるエネルギー・食糧問題や、人々の食生活の変化などにより増加の一途を辿っている。しかし、日本の油脂自給率は他の先進国よりもかなり低く、カロリーベースで 3%程度である。それゆえ国内の油脂は世界情勢の変化や自然災害による価格変動にさらされており、日本独自の油脂生産法の確立は急務である。本研究で注目した油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* は様々な糖を資化し、油脂を細胞内に蓄積するため、多量の国内食品残さの糖化液を原料とした持続的な油脂生産が期待できる。また、*L. starkeyi* の油脂の主成分であるトリアシルグリセロール（TAG）の脂肪酸組成は植物油と類似しているため、日本国内の食用油脂自給率の向上に貢献できると考えられる。しかし、*L. starkeyi* の油脂生産性は産業利用の面から未だ低く、育種、遺伝子工学技術等による生産性の改善が必要だが、油脂合成・分解経路に関する知見は少ない。そこで本研究では、この酵母の油脂高蓄積変異株を取得し、油脂合成・分解経路の遺伝子発現解析を行うことで油脂合成及び分解に強く関与する遺伝子の同定を目的とした。

まず、野生株 *L. starkeyi* CBS1807 に EMS を用いて突然変異の誘発を行った後、本研究室で確立された、水と油の密度の違いを利用した油脂蓄積変異株の濃縮法を利用し、油脂高蓄積変異候補株の濃縮を行った。その後、コロニー単離した候補株の油脂生産量及び糖消費速度を指標にスクリーニングを行い、油脂高蓄積変異株を 16 株取得した。そのうち、特に油脂生産及び糖消費速度の速かった株は K13、K14 であった。K13 について評価培養を行ったところ、油脂生産量が野生株の約 2 倍に上昇していた。野生株との油脂合成・分解関連遺伝子発現量の比較を行ったところ、K13 においては、アシル CoA 合成に関与する遺伝子である *ACL1*, *ACC1*, *FAS1*, *FAS2* に WT の 2 倍以上の高発現がみられた。このことから、K13 はこれら 4 遺伝子の高発現によるアシル CoA 量の増加によって油脂を高蓄積していると考えられた。現在、K14 株についての形質、遺伝子発現解析を実施しており、解析後は、昨年度の農芸化学会で報告した油脂高蓄積変異株 E15、E47、A42 の遺伝子発現解析結果も加えて、油脂酵母 *L. starkeyi* の油脂蓄積に強く関与する重要遺伝子を同定する。なお、本研究は NEDO「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発」、JSPS 科研費 15K07372 の支援を受けて行われた。

*Lipomyces starkeyi*, oleaginous yeast, lipid

講演番号：2C23p02
講演日時：3 月 18 日 14:15～ C 校舎 23 会場

油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* における油脂高蓄積変異株の育種
Breeding of oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* mutants accumulating a high-level of lipid
○海老名 沙也佳[1]、春日 琴葉[1]、志田 洋介[2]、小笠原 渉[2]、山崎 晴丈[1]、高久 洋暁[1]([1]新潟薬大・応生科、[2]長岡技科大・工)
○ Sayaka EBINA[1], Kotoha KASUGA[1], Yosuke SHIDA[2], Wataru OGASAWARA[2], Harutake YAMAZAKI[1], Hiroaki TAKAKU[1] ([1]Fac. Appl. Life Sci.,Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [2]Nagaoka Univ. Technol.)

日本の食用油脂は輸入に大きく依存しており、自給率の向上は急務である。しかし日本の農業人口の減少、気候条件や国土面積を考慮すると、油糧植物からの油脂獲得は困難である。そこで本研究では糖を資化して細胞内に脂肪球として油脂を蓄積する油脂酵母に注目した。その中でも本研究で取り扱う *Lipomyces starkeyi* は、食品・醸造残さなどのバイオマス由来の様々な糖から油脂生産が可能である。また、 *L. starkeyi* が生産する油脂は植物油と似た性状を持ち、食用油として有望である。しかし *L. starkeyi* の産業利用のためには油脂生産性の向上が不可欠であると考えられているため、本研究では油脂高蓄積変異株を取得することを目的とした。

本研究室では、これまでに自己密度形成能を有する Percoll 試薬を用いた密度勾配遠心法を利用して、油脂高蓄積変異株を取得している。Percoll 試薬に菌体を混合し遠心すると、水と油脂の密度の違いから油脂を高蓄積した細胞を上層に分画することができる。この原理を利用して、*L. starkeyi* の野生株に変異処理を施した後、その変異処理群を密度勾配遠心により分離し、上層を分取、培養後、さらに遠心分離する操作を繰り返すことで油脂高蓄積変異株の濃縮を行った。細胞内蓄積油脂を Nile red で染色し、Flow cytometry による細胞内油脂量の測定及び顕微鏡観察で油脂高蓄積変異株の濃縮を確認した。得られた濃縮画分をプレートに撒き、油脂高蓄積変異候補株としてコロニー単離を行った。その後、候補株について Flow cytometry 及び顕微鏡観察によるスクリーニングを行った結果、油脂高蓄積変異株を 3 株（E15, E47, A42）取得した。これらの油脂高蓄積変異株の中では、E15 株の細胞当たりの油脂蓄積量が野生株の 1.8 倍であり、最も高い値を示した。そこで本研究では、さらに油脂蓄積量の多い変異株を取得するため、油脂高蓄積変異株 E15 株に対し UV 照射による変異処理を施し、先と同様の密度勾配遠心を行った。その際 E15 株をコントロールとし、E15 株よりもさらに低密度である細胞群を濃縮した。濃縮画分をプレートに撒き、コロニーを単離し、50 mL チューブを用いた小スケール培養による一次スクリーニングを行った。顕微鏡観察及び Flow cytometry 解析により選抜された株について、次にバッフルフラスコを用いた培養を行い、油脂量を測定し、二次スクリーニングを行った。この二段階のスクリーニングを行ったところ、油脂蓄積量が野生株の 4.2 倍、E15 株の 1.6 倍に上昇した変異株を取得した。現在はこれらの変異株について、さらに詳細な表現型解析を行っている。なお、本研究は NEDO「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発」、JSPS 科研費 15K07372 の支援を受けて行われた。

*Lipomyces starkeyi*, oleaginous yeast, lipid

講演番号：2C23p03
講演日時：3 月 18 日 14:30～ C 校舎 23 会場

油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* における脂肪酸の分泌発酵生産
Metabolic engineering of oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* for over production and secretion of fatty acids from glucose
○佐野 真那理[1]、志田 洋介[2]、小笠原 渉[2]、山崎 晴丈[1]、高久 洋暁[1]([1]新潟薬大・応生科、[2]長岡技科大・工)
○Manari SANO[1], Yosuke SHIDA[2], Wataru OGASAWARA[2], Harutake YAMAZAKI[1], Hiroaki TAKAKU[1] ([1]Fac. Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [2]Nagaoka Univ. Technol)

脂肪酸はエネルギー源や細胞膜成分としての魅力的な生体分子であるとともに様々な化成品を合成するのに重要な前駆体物質である。近年、植物油脂は世界中の燃料と化成品の原料として、需要が高まってきたことから脂肪酸不足が危惧される。そこで、我々は植物油脂と同様の脂肪酸組成をもつ微生物油脂に注目した。酵母、カビ、藻類からバクテリアにわたる油糧微生物は、それらのバイオマスの 20%以上まで細胞内に油脂を蓄積する能力をもっている。さらに、*Lipomyces starkeyi* や *Rhodosporidium toruloides* といった一部の酵母は、乾燥菌体重量の 70%以上まで油脂のトリアシルグリセロールを細胞内に蓄積することができる。本研究室では、*L. starkeyi* における油脂生合成・分解、脂肪酸生合成・分解に関する研究を行い、その経路について明らかにしてきた。さらに我々は *L. starkeyi* の遺伝子工学的手法（形質転換、遺伝子高発現システム、遺伝子破壊システムなど）を開発してきた。上記情報及び技術を活用することにより、*L. starkeyi* を高脂肪酸生産微生物に改変できる可能性がある。

そこで本研究では、遺伝子工学的改変技術を活用して、油脂酵母 *L. starkeyi* の脂肪酸分泌発酵生産株の構築を目的とした。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においてアシル CoA 合成酵素をコードする *FAA1* 遺伝子を欠失させた変異株では、細胞内遊離脂肪酸量の増加だけでなく、細胞外へ脂肪酸を分泌発酵生産することが知られている。このことから、我々は *L. starkeyi* においてアシル CoA 合成酵素をコードする *LsFAA1* と *LsFAA2* 遺伝子を欠失させた遺伝子破壊株Δ*lsfaa1* 株とΔ*lsfaa2* 株、二重破壊株であるΔ*lsfaa1*Δ*lsfaa2* 株を作製した。野生株と比較して各遺伝子破壊株（Δ*lsfaa1*, Δ*lsfaa2*, Δ*lsfaa1*Δ*lsfaa2*）の生育速度、グルコース消費速度、油脂蓄積速度は低下した。しかしながら、変異株の培養上清を調べてみたところ、白濁し、脂肪酸が分泌されていた。野生株ではほとんど脂肪酸を分泌発酵生産しないが、Δ*lsfaa1* 株、Δ*lsfaa1*Δ*lsfaa2* 株の脂肪酸分泌発酵生産量は著しく増加し、野生株の数百倍であった。Δ*lsfaa2* 株の脂肪酸分泌発酵生産量も増加したが、野生株の 2 倍程度であったことから、*FAA1* 遺伝子の欠失は、脂肪酸分泌発酵生産に大きく寄与することが示唆された。現在、細胞内遊離脂肪酸の定量を行っており、細胞内に多量の遊離脂肪酸が蓄積した結果、分泌に繋がったのか、能動的に分泌生産されているかについて調査中である。なお、本研究は NEDO「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発」、JSPS 科研費 15K07372 の支援を受けて行われた。

oleaginous yeast, *Lipomyces starkeyi*, fatty acid

発表責任者：高久洋暁（htakaku@nupals.ac.jp）

講演番号：2C23p04
講演日時：3 月 18 日 14:45～ C 校舎 23 会場

# 核酸生産菌へのメカノセンシティブチャネル遺伝子の導入効果

# Introduction effect of mechanosensitive channel gene into nucleic acid producing bacteria

○森 陸也、小西 智之、三井田 周平、橋本 賢一、川崎 寿（東京電機大学）
○ Rikuya MORI, Tomoyuki KONISHI, Syuhei MIIDA, Kenichi HASHIMOTO, Hisashi KAWASAKI (Tokyodenki Univ.)

[背景および目的]イノシン酸は鰹節のうま味成分、グアニル酸は干しシイタケのうま味成分として知られており、核酸系調味料として用いられている。イノシン酸は微生物を用いた直接発酵の例はあるが、細胞内から外へ排出する排出担体は知られていない。また、グアニル酸は直接発酵の例は知られていない。そこで、イノシン酸やグアニル酸を排出する担体を導入することで、直接発酵を目指して研究を行っている。*Corynebacterium glutamicum*(*C. glutamicum*) は生産したグルタミン酸を *NCgl1221* 遺伝子産物を介して排出していることが知られている。我々は、細胞膜を介したイオンの移動を電流値として測定するパッチクランプ法を用いてこの *NCgl1221* 遺伝子産物がグルタミン酸だけでなく、アスパラギン酸やフェニルアラニンのアナログであるフェニルプロピオン酸、リジンを通過させることも明らかにした。そこで、この遺伝子産物がイノシン酸やグアニル酸を排出する担体として利用できるのではと考え、イノシン酸やグアニル酸を生産する株に *C. glutamicum* 由来 *NCgl1221* 遺伝子を導入しイノシン酸やグアニル酸の生産量にどのような影響を及ぼすか検討を行った。

[実験方法]イノシン酸やグアニル酸を生産するよう育種された大腸菌株である *Escherichia coli* I*ushAaphA*/PMWKQ(*J Mol Microbiol Biotechnol.*,2007;13:96-104)に *NCgl1221* のグルタミン酸生産を誘導する変異型遺伝子(A111V または W15CSLW)を、プラスミドを用いて導入した。生育は吸光度 660nm で培養時間 6,12,18,24,36,48 時間目のサンプルの濁度($OD_{660}$)分析を行った。生産物は液体クロマトグラフィーで 12,24,36,48 時間目のサンプルの分析を行った。

[結果]〈生育〉対照株は $OD_{660}$ が本培養開始から 36 時間で 8.9 であるのに対し、導入株は本培養開始から 12 時間で 10 であり、*NCgl1221* 変異型遺伝子導入による生育の向上が確認された。
〈生産物〉イノシン酸およびグアニル酸の生産量は、対照株は本培養開始から 36 時間目で培養液上清に蓄積を始めたが、導入株は本培養開始から 24 時間目に蓄積を始めた。また、48 時間目では、イノシン酸の蓄積量は対照株が 0.34 g/L であるのに対し、導入株は 0.48 g/L であった。グアニル酸の蓄積量は対照株が 0.21 g/L であるのに対し、導入株は 0.28 g/L であり、*NCgl1221* 変異型遺伝子導入によって、生産のスピードや生産量の向上が確認された。

Inosine 5'-monophosphate, Guanosine 5'-monophosphate, Mechanosensitive channel

発表責任者：川崎 寿（kawasaki@cck.dendai.ac.jp）

講演番号：2C23p05
講演日時：3 月 18 日 15:00～ C 校舎 23 会場

# 分子動力学シミュレーションを用いた Tween 40 による Corynebacterium glutamicum のグルタミン酸過剰生成誘導機構における機械刺激応答の解析

# Analysis of mechanosensing mechanism in the induction mechanism of glutamate production using Tween 40 in Corynebacterium glutamicum using molecular dynamics simulations

○澤田 康之[1]、橋本 賢一[2]、中松 亘[2]、曽我部 正博[1]、川崎 寿[2] ([1]名大院・医、[2]東京電機大・工)
○Yasuyuki SAWADA[1], Ken'ichi HASHIMOTO[2], Tsuyoshi NAKAMATSU[2], Masahiro SOKABE[1], Hisashi KAWASAKI[2] ([1]Nagoya Univ., [2]Tokyo Denki Univ.)

【背景および目的】
工業的なグルタミン酸の生産に用いられているCorynebacterium glutamicumは通常の生育条件では細胞外にグルタミン酸を蓄積することはないが、界面活性剤Tween 40を添加することで生育が抑制され、細胞外にグルタミン酸を蓄積する。Tween 40添加によるグルタミン酸過剰生成条件では菌体の脂肪酸含量が低下していることなどが既に報告されているが、その作用点は未だ明確ではない。
近年、この微生物のNCgl1221遺伝子がグルタミン酸の過剰生成に深く関与していることが示された。我々はこれまでの研究で、このNCgl1221遺伝子産物が膜張力に依存して開口するメカノセンシティブチャネルであること、ATPなどのエネルギーを使わず、濃度勾配のみによりグルタミン酸を通過させることを明らかにしてきた。本研究はこれまで明確に示されてこなかったTween 40の作用点を解析し、グルタミン酸過剰生成誘導との関係について検討することを目的とした。

【方法及び結果】
通常の生育条件下での C. glutamicum の脂肪酸（残基）の 95%以上はパルミチン酸とオレイン酸である。Tween 40 添加によるグルタミン酸生産条件では非グルタミン酸生産条件と比較し、オレイン酸含量が約 41%低下し、パルミチン酸とオレイン酸の含量の総量に関しても全体で約 25%減少する結果となった。我々は、Tween 40 添加が引き起こす脂肪酸組成変化ならびに脂肪酸の総量がグルタミン酸過剰生成に及ぼす影響を検討するため、グルタミン酸排出担体であるメカノセンシティブチャネルの開口過程の分子動力学シミュレーションを行った。その際、脂肪酸総量を通常の濃度に対して25%減少させた細胞質膜のモデルならびにその細胞質膜の脂肪酸組成比も変化させた 4 通りのモデルを作成し、脂質膜として利用した。その結果、脂肪酸の総量を減らした脂質膜モデル内のメカノセンシティブチャネルは減らす前の脂質膜内のそれより開口しやすくなる様子を見せた。さらにその開口挙動は、パルミチン酸とオレイン酸の組成比によっても違いが見られ、特に異なる脂肪酸間の相互作用が安定している組成比の脂質膜内ではより開口しやすくなる事を定量的に考察できた。よって、メカノセンシティブチャネルは脂肪酸総量の少ない脂質膜内において、脂肪酸間相互作用が安定している環境のほうが膜張力を効率的に受容できると考えられ、その結果として開口挙動が影響されたと考えられる。

mechanosensitive channels, glutamate production, molecular dynamics simulations

発表責任者：澤田　康之（ysawada@med.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2C23p06
講演日時：3 月 18 日 15:25～ C 校舎 23 会場

*Saccharomyces bayanus* 菌株のパン生地発酵力の改良
Improvement of *Saccharomyces bayanus* strain for the leavening ability in dough.
○横山 愛、川上 秋桜、山内 宏昭、小田 有二（帯広畜産大食品）
○Megumi YOKOYAMA, Sakura KAWAKAMI, Hiroaki YAMAUCHI, Yuji ODA (Obihiro Univ. of Agri. and Vet. Med.)

【目的】一般的なエタノール発酵や製パン用の酵母といえば *Saccharomyces cerevisiae* を指すが、ワイン醸造等に *S. bayanus* が使用されることは珍しくない。その理由として、*S. bayanus* はエタノール発酵能が *S. cerevisiae* より劣るものの、香気成分を多く生成することにより官能的に優れた製品が得られるためである。演者らは、従来とは異なった風味を呈する高品質かつ差別化されたパンをつくるため、*S. bayanus* 菌株の中からパン生地発酵力の比較的高い菌株として NBRC 1343 を選抜した*。しかしながら、実際の製パンに適用するまでの水準には達していなかったため、菌株改良を試みた。
【方法】酵母菌株は YPS 培地（2.0% Yeast extract, 4.0% Peptone, 0.2% $KH_2PO_4$, 0.1% $MgSO_4$・$7H_2O$, 0.05% アデカノール LG-294, 2.0% スクロース）で 30℃、24 時間振盪培養し、回収した湿菌体（固形分 33%）を使用した。パン生地発酵力は、糖無添加または 5%スクロース（対小麦粉重量）を含むパン生地からのガス発生量(ml/2h/10g 小麦粉)として計測した。製パン試験は小麦粉 300g を使用した食パン配合による中種法で行った。対照として *S. cerevisiae* の市販パン酵母分離株(CBY)を使用した。
【結果】*S. bayanus* NBRC1343 はパン配合の必須成分である NaCl によりパン生地発酵が著しく阻害され、またマルトース発酵性の発現が遅いために糖無添加パン生地（中種生地）の発酵が不十分という欠点があった*。NBRC 1343 は CBY よりも耐塩性が低く 10%NaCl を含む寒天培地で生育が阻害されたため、同培地で生育可能な変異株の取得を試みたが分離できなかった。そこで NBRC 1343 の中から 0.15% 2-デオキシグルコースを含む最少マルトース寒天培地上で生育可能な自然突然変異株 24 株を分離したところ、そのうちの 1 株 BD17 が親株 NBRC 1343 よりも有意に高い糖無添加パン生地発酵力を示した。BD17 をスクロースで培養した菌体(B17-S)、NBRC 1343 をスクロースで培養した菌体(PB-S)、NBRC 1343 をマルトースで培養した菌体(PB-M)のα-グルコシダーゼおよび糖無添加パン生地からのガス発生量は測定すると、いずれも PB-M>BD17-S>PB-S の順であることから BD17 をマルトース発酵性が構成的に発現している変異株と推定した。次ぎに、これらの菌体を使用して、CBY をスクロースで培養した菌体(CBY-S)を対照とした中種法による製パン試験を行った。パン比容積(ml/g)は CBY-S, 5.78、PB-M, 5.28、BD17-S, 4.55、PB-S, 3.49 であった。焼成したパンの官能評価を行うと、*S. bayanus* の 3 菌体でつくったパンはいずれも焼き色、味、香りの項目で CBY よりも高得点であり、特に BD17-S でつくったパンは香りにおいて最高点を収めた。
*横山ら，平成 28 年度日本農芸化学会北海道支部第 2 回講演要旨集 p10

Saccharomyces bayanus, dough leavening, bread making

講演番号：2C23p07
講演日時：3 月 18 日 15:40～ C 校舎 23 会場

# 黒麹菌による甘柿および渋柿成熟果の発酵および機能性への影響

Effect of fermentation using *Aspergillus awamori* on functionality of mature persimmons

○折居 千賀（（公財）東洋食品研究所）
○Chika ORII (Toyo Institute of Food Technology)

【目的】柿（*Diospyros kaki*）は古来よりなじみ深い果物だが、他の果実と比べると生食や干柿以外の応用が難しい食材であるとされている。そこで、廃棄果実を含めた柿の有効活用手段として、発酵に注目し検討を行ってきた。これまでに富有柿幼果を対象とした発酵により β-リパーゼ阻害活性あるいはアンジオテンシン変換酵素阻害活性（ACE 阻害活性）が増強することを明らかにした [1)]。そこで、本研究では新たに甘柿および渋柿の成熟柿を対象として黒麹菌を用いた発酵を行い、β-リパーゼや ACE 阻害活性、ポリフェノール量および DPPH ラジカル消去活性に対する影響を調べた。

【方法】富有柿（完全甘柿）および白皮柿（完全渋柿）の成熟果を対象とし、発酵には果実部のみを用いた。幼果の発酵と同様に、100℃の熱水中で 10 秒間，煮沸処理を行い、殺菌の代用とした。煮沸後に果実を細断し、黒麹菌の胞子懸濁液を 2.0 ml を添加し，好気条件下，35℃で 7 日間発酵を行った。発酵終了後に水抽出（4℃、4 日間）を行い、得られた抽出液を減圧乾固し、発酵物抽出物を得た。抽出物を 10%(w/v)となるように水に再溶し、試料液とした。同試料液について、ポリフェノール量、DPPH ラジカル消去活性のほか、β-リパーゼ阻害活性（抗肥満）および ACE 阻害活性（血圧上昇抑制）について $IC_{50}$ 値を調べ、比較した。発酵はいずれも N=3 で行った。

【結果】富有柿成熟果では、発酵後 β-リパーゼ阻害活性で弱い阻害活性（$IC_{50}$=6390.5μg/ml）が見られたが、幼果発酵物と比較すると弱い阻害活性の増加にとどまった。また、ACE 阻害活性、ポリフェノール量および DPPH ラジカル消去活性において発酵後の顕著な活性の増加は見られなかった。これらの結果は富有柿幼果を原料にしたときとは大きく異なっていた。一方、白皮柿の成熟果では、リパーゼ阻害活性で発酵 0 日目（$IC_{50}$=15.3μg/ml）に対し、7 日目（$IC_{50}$=0.52μg/ml）では著しい阻害活性の増加が見られた。ACE 阻害活性では 0 日目（$IC_{50}$=670.5μg/ml）に対し、7 日目（$IC_{50}$=292.1μg/ml）であり、こちらも同様に発酵にともなう阻害活性の増加が見られた。また、ポリフェノール量では 0 日目（2.8 mg-没食子酸相当量/1.0 g 発酵物抽出液）に対し、7 日目（59.3 mg-没食子酸相当量/1.0 g 発酵物抽出液）は増加、DPPH ラジカル消去活性もまた 0 日目（13.8 μmol-トロロックス相当量/1.0 g 発酵物抽出液）に対し、7 日目（184.7 μmol-トロロックス相当量/1.0 g 発酵物抽出液）は増加傾向にあった.これらのことより、黒麹菌を用いた発酵は、渋柿の成熟柿が有する抗肥満などの機能性を増強することを明らかにし、発酵は渋柿成熟果の機能性増強にも有用であることを示唆した。

1)日本栄養・食糧学会誌、Vol. 68、p225-232(2015)

persimmon, fermentation, *Aspergillus awamori*

講演番号：2C23p08
講演日時：3 月 18 日 15:55～ C 校舎 23 会場

# 乳酸菌 *Enterococcus faecalis* に見出された好気性乳酸発酵の発現メカニズムの解明

# Mechanism of aerobic lactic acid fermentation found in *Enterococcus faecalis*

○土肥 裕希（岡山理大・工）
○Yuki Doi (Okayama Univ. of Science)

【諸言】*Enterococcus faecalis* はグリセロール資化性を特徴とするヘテロ乳酸菌であり、好気条件下ではグリセロールから乳酸とともに酢酸とアセトインを発酵生産する。ところが、高濃度のグリセロールを炭素源として添加された *E. faecalis* は、好気条件下にもかかわらず乳酸のみを活発に生産した。我々はこの代謝を「好気性乳酸発酵」と命名し、その発現メカニズムの解明を行った。

【結果】フラスコを用いた *E. faecalis* の好気培養では、0.5 M グルコース（C6）から発酵生産される乳酸量が 0.5 M であったのに対し、1.0 M グリセロール（C3）から発酵生産される乳酸量は 0.9 M に達した。このことは、高濃度のグリセロールを炭素源として用いた場合、*E. faecalis* の代謝経路が乳酸の生産に限定されることを示した。同様の培養を 1 vvm で通気されたジャーファメンターを用いて行ったところ、*E. faecalis* は 300 rpm 以上の攪拌速度下で良好に生育し、フラスコと同等量の乳酸を生産した。一方で、200 rpm 以下の攪拌速度では、菌の生育および乳酸生産量は著しく低下した。なお、いずれの条件においても、生産される乳酸量は乳酸脱水素酵素遺伝子（*ldhL1*）の破壊によって 9 割以上減少した。これらの結果は、高濃度のグリセロールで培養された *E. faecalis* は、その生育（代謝）に多量の酸素を要求するが、細胞内では嫌気代謝である乳酸発酵のみが行われるというユニークな代謝を行うことを示した。

この代謝機構を解明するため、*E. faecalis* のピルビン酸代謝を担う酵素遺伝子の発現と細胞内レドックスバランスを解析した。興味深いことに、乳酸脱水素酵素遺伝子（*ldhL1*）は、攪拌速度や炭素源などに影響されず、常に一定の発現を示した。一方で、グリセロールを資化している *E. faecalis* では、ピルビン酸の好気代謝を担う酵素遺伝子の発現が総じて強く抑制されていた。また、その嫌気代謝を担う *ldhL1* 以外の酵素遺伝子は発現が認められたが、それらの反応産物が認められなかったことから、代謝には関与していないことが示唆された。グリセロールを資化している *E. faecalis* の細胞内 NADH/$NAD^+$比は極めて高い状態にあり、それは攪拌速度（酸素供給量）が低い条件で培養された細胞ほど顕著であった。このことは、*E. faecalis* は NADH の酸化に酸素を利用しているが、その酸化反応が NADH 産生に追いつかず、細胞が還元ストレスに曝されていたことを示唆した。

以上の結果から、*E. faecalis* の好気性乳酸発酵は、「乳酸脱水素酵素遺伝子の恒常的発現」、「還元ストレス（過剰な NADH）によるピルビン酸の好気代謝を担う酵素遺伝子の発現抑制」、「酸素によるピルビン酸の嫌気代謝を担う酵素の抑制・失活」によって引き起こされていたことが示唆された。

lactic acid fermentation, Enterococcus faecalis, glycerol metabolism

発表責任者：土肥　裕希（yuki.doi.doct@gmail.com）

講演番号：2C23p09
講演日時：3 月 18 日 16:10～ C 校舎 23 会場

泡盛もろみより新たに分離された乳酸菌フェノール脱炭酸酵素遺伝子の機能解析
Functional analysis of gene for phenolic acid decarboxylase in Lactic acid bacterium newly isolated from awamori moromi
○仲宗根 薫、上原 誠（近畿大工）
○Kaoru NAKASONE, Makoto UEHARA (Kindai Univ.)

泡盛はインディカ米を原料とする沖縄の蒸留酒で、黒麹菌と泡盛酵母が関与し、これを特徴付ける芳香成分の一つにバニリン(V)がある。これは原料米中のフェルラ酸(FA)がフェノール酸脱炭酸酵素(Phenolic Acid Decarboxylase；PAD)により 4-ビニルグアヤコール(4-VG)へ変換され酸化により生成する。従って泡盛の芳香生成における PAD の重要性が示唆されるが、本酵素活性がどの微生物由来なのか？は明らかではない。黒麹菌はクエン酸を生産しもろみ中の雑菌混入を防ぐが、乳酸菌はクエン酸存在下でも生き延びる。これは泡盛の発酵系は黒麹菌と酵母のみではなく、第 3 の微生物が関与する複合的な発酵系と捉えることができる。本研究では、泡盛もろみより分離した乳酸菌の役割を評価し、PAD がどの微生物由来か？を明らかにし、泡盛芳香改良のヒントを得ることを目的とするために、本遺伝子の誘導と発現の検討を行った。もろみから乳酸菌の分離を試み、グラム染色及び糖資化性試験、16SrDNA 解析を行った。また黒麹菌及び泡盛酵母ゲノム配列を用いて PAD 遺伝子を探索した。さらに乳酸菌添加と未添加の泡盛もろみを作成し、FA・4-VG・V 濃度を測定した。さらに PAD 遺伝子誘導条件の検討も行った。上記解析により分離された乳酸菌は *Lactobacillus plantarum* を示し、ゲノム上に PAD 遺伝子が見いだされ、もろみ中での 4-VG 変換の寄与が示唆された。黒麹菌にも PAD 遺伝子が見いだされたが、泡盛酵母にはコードされていなかった。従ってもろみ中での F から 4-VG 変換への寄与は、黒麹菌及び乳酸菌の両者が関与している可能性があり、乳酸菌添加・未添加もろみの FA、4-VG、V 濃度を比較したところ、添加もろみ中の 4-VG 濃度の増加が確認された。これは、乳酸菌が関与する複合的な発酵系による、泡盛芳香生成への寄与を示唆する。現在、PAD の発現誘導メカニズムなど詳細な解析を行っている。

awamori, lactic acid bacteria, phenolic acid decarboxylase

発表責任者：仲宗根薫（nakasone@hiro.kindai.ac.jp）

講演番号：2C23p10
講演日時：3 月 18 日 16:25～ C 校舎 23 会場

# コリネ型細菌のシステイン生産におけるシスチン取り込みタンパク質ホモログ欠損の効果

# Disruption of a cystine uptake protein homolog increases cysteine production in *Corynebacterium glutamicum*

○近藤 麻梨子、平沢 敬（東工大生命理工学院）
○Mariko KONDOH, Takashi HIRASAWA (Dept. Life Sci. Technol., Tokyo Tech.)

【研究の背景・目的】

システインは、医薬品の原料や食品添加物として利用されており、年間約 5,000 トンが生産されている。現在のシステインの製法は、人毛や獣毛に含まれるタンパク質からの抽出が主であるが、環境への影響の大きさなどが問題視されている。そのため我々は、種々のアミノ酸発酵の実績を持つコリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* を宿主とし、発酵法によるシステインの生産を実現することを目的として研究を進めている。

我々は現在までに、システインやその前駆体であるセリンの生合成に対するフィードバック阻害の解除を行うことによって、システインを細胞外に排出する株を構築した。しかしながら、培養の経過とともにシステイン生産の低下がみられた。これは、いったん細胞外に排出されたシステインが再び細胞内に取り込まれているためではないかと考えた。細胞外に排出されたシステインは酸化されてシスチンになると考えられるため、本研究ではシスチンの細胞内への取り込みに着目し、これを抑制することでシステイン生産の向上を試みた。

【実験方法・結果】

コリネ型細菌において、シスチンの取り込みに関与するタンパク質は明らかになっていない。そこで、大腸菌および *Streptococcus mutans* における既知のシスチン取り込みタンパク質のアミノ酸配列との相同性を比較することによって、コリネ型細菌においてシスチンの取り込みに関与すると考えられるタンパク質をコードする遺伝子の候補を決定した。候補として挙げられた遺伝子の欠損株を構築し、さらにシステインやセリンによるフィードバック阻害の解除を行った。この組換え株を用いて培養実験を行ったところ、候補遺伝子の欠損を行っていない株よりも培養上清中のシステイン＋シスチン濃度の減少速度が低下することが確認された。そこで、候補遺伝子に加えて細胞内でシステインの分解を行う酵素である cysteine desulfhydrylase をコードする *aecD* 遺伝子を欠損した二重欠損株を構築し、同様にフィードバック阻害の解除を行った。構築した組換え株を用いて培養実験を行ったところ、二重欠損株では培養開始から培養上清中のシステイン＋シスチン濃度が減少を始めるまでの時間が延長され、より多くのシステインが生産されることが明らかになった。

本研究は、農林水産省「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」の一環として行われたものである。

*Corynebacterium glutamicum*, cysteine, cystine uptake protein homolog

発表責任者：平沢敬（thirasawa@bio.titech.ac.jp）

講演番号：2C23p11
講演日時：3 月 18 日 16:50～ C 校舎 23 会場

# 納豆菌及び枯草菌によるう蝕原性バイオフィルム抑制効果の検討

# Study on the inhibitory effect of cariogenic biofilm by *Bacillus subtilis*

○中村 知世、成澤 直規、鳥居 恭好、竹永 章生（日大院・生資科）
○Tomoyo NAKAMURA, Naoki NARISAWA, Yasuyoshi TORII, Fumio TAKENAGA (Nihon Univ.)

【目的】う蝕とは口腔内細菌の代謝産物である酸により歯のエナメル質が脱灰することで生じる口腔疾患の 1 つである。特に *Streptococcus mutans* は酸生産性・酸耐性に優れ、スクロースを基質として歯面への付着能とバイオフィルム（以下 BF）形成能が高いことから、主要なう蝕原性細菌と考えられている。当研究室ではこれまでに納豆抽出液が *S. mutans* の生育に影響することなく BF 形成を抑制すること、当該物質は熱に感受性であることを明らかにしている。また、納豆菌が生産するナットウキナーゼやスクラーゼの標準品が *S. mutans* の BF 形成を抑制することも明らかにしている。そこで本研究では、納豆菌及びその近縁種である枯草菌の代謝産物に着目し、BF 形成抑制効果の検討を行った。

【方法】供試菌株として枯草菌 *Bacillus subtilis* 168 株、納豆菌 *B. subtilis natto* Miyagino 株を含む 3 株及びう蝕原性細菌の *S. mutans* FSM11 株を使用した。*S. mutans* の前培養は Brain Heart Infusion 液体培地で 37℃、5%$CO_2$ 条件で 20 h とした。BF 形成は 0.25%スクロース添加 Tryptic soy broth without dextrose 液体培地を使用し、96 well titer plate に *S. mutans* の前培養液を 1%量植菌し 37℃、5%$CO_2$ 条件で 20 h 培養した。培養後、well 底部に付着した細胞を染色し、色素抽出後、吸光度（492 nm）を測定することで BF 形成量を評価した。*S. mutans* と枯草菌または納豆菌の共培養条件では各前培養菌液を 1%ずつ植菌した。培養ろ液は BF 形成評価に用いた培地と同様の液体培地に植菌し、37℃・振とう条件にて 15 h 培養後、0.22 μm のフィルター除菌により取得した。枯草菌細胞破砕液は培養後の細胞を 10 倍濃縮したリン酸緩衝生理食塩水中にて細胞破砕し、上記同様除菌したものを用いた。

【結果及び考察】Miyagino 株を含む納豆菌 3 株及び枯草菌 *B. subtilis* 168 株と *S. mutans* を共培養したところ、いずれの組み合わせにおいても大幅に BF 形成が抑制された。納豆菌及び枯草菌単独条件において BF 形成はみられなかったことから、この減少は *S. mutans* の BF 量低下によるものと考えられた。また、納豆菌 3 株の各培養ろ液を 50%量添加した条件で *S. mutans* を培養したところ約 50%の BF 形成抑制効果が認められた。しかし、枯草菌の培養ろ液を上記同様に加えた条件では BF 形成抑制効果が認められなかった。よって納豆菌と枯草菌では、BF 抑制メカニズムが異なるものと考えられた。枯草菌の細胞破砕液を 50%量添加した条件で *S. mutans* を培養した結果、若干の BF 形成抑制効果が認められた。よって、枯草菌による BF 抑制の一部は菌体内成分が影響するものと考えられた。

*Streptococcus mutans* , biofilm, *Batillus subtilis natto*

発表責任者：成澤直規（narisawa.naoki@nihon-u.ac.jp）

講演番号：2C23p12
講演日時：3 月 18 日 17:05～ C 校舎 23 会場

農産品由来プロバイオティクスの機能性評価
Evaluation of functional probiotics isolated from agricultural products
○根来 雄哉、高屋 朋彰（小山高専物質）
○Yuya NEGORO, Tomoaki KOUYA (NIT. Oyama Col.)

【背景・目的】栃木県は生乳生産量全国第 2 位の畜産県である．しかし，コスト高・採算性の問題や生産業者の減少，輸入乳製品との価格競争，家畜飼料価格の高騰などの理由から，全国の酪農家戸数は 1 年間当たり約 1,000 戸ずつ減少し，国内の生乳生産量も減少し続けている．その一方で，昨今では生乳消費拡大の観点からナチュラルチーズが注目を集めており，生産量はここ 20 年で 1.6 万 t 増加している．本研究では，栃木県の地域特産品からチーズ製造に利用できる微生物を分離し，プロバイオティクスの機能性を評価した．
【方法】分離源として県北地域のウシ生乳，漬物，赤ワイン滓およびネギを用いた．乳酸菌の分離用培地として MRS 培地および MRS 寒天培地を用いた．乳酸菌の選別・同定は，HPLC を用いた乳酸生産量の測定，X-gal を用いた乳糖分解酵素（β-galactosidase）生産能の判別，リトマスミルクを用いた乳タンパク質の酸凝固性評価，血液寒天培地を用いた安全性評価，および 16S rDNA 解析による微生物の同定を行った．また，選別した乳酸菌について，プロバイオティクスの機能性評価として，人工胃液・人工腸液への曝露試験による生残性評価，腸管モデル細胞(Caco-2 細胞)への曝露試験による付着性試験を行った．
【結果・考察】本研究では，ウシ生乳，漬物，赤ワイン滓およびネギから 16 菌株の乳酸菌を単離することに成功した．またその中から，乳糖分解酵素を有し，溶血素を生産せず，乳タンパク質の酸凝固性を示した菌株は 9 菌株で, 乳製品製造に利用可能であることが示唆された. 特に酸凝固性の高かった，ONCT6002，6009，6011，6013 株に対し，人工胃液と人工腸液を用いた胃酸・胆汁酸耐性を評価した結果，ONCT 6011 株は人工胃液に曝露（3 h）した後の生残性が初期生菌数に対して減少しなかったことから，胃酸耐性が高いことが示唆された．また，人工胃液に曝露した ONCT 6002，6009，6011，6013 株をさらに人工腸液に曝露（7 h）した結果，生残性は 48～68%まで維持または増加したことから，人工胃液中で減少した乳酸菌の生残性は人工腸液中で回復することが示唆された．腸管モデル細胞(Caco-2 細胞)への乳酸菌の付着性試験において, ONCT6002, 6009, 6011, 6013 株は各初期生菌数に対して， 0.6~3.2%の付着率を示したことから，腸管細胞への付着性を有することが示唆された．現在，Caco-2 細胞を用いて, ELISA による各乳酸菌の抗炎症性（IL-8 産生抑制能）の評価に取り組んでいる．

lactic acid bacteria, dairy products, dregs of wine

発表責任者：高屋朋彰（tkouya@oyama-ct.ac.jp）

講演番号：2C23p13
講演日時：3 月 18 日 17:20～ C 校舎 23 会場

# 各種初発条件における生酛酒母の成分及び微生物叢解析に関する研究

# Bacterial composition of kimoto on each initial condition

○下田 隆正[1]、高橋 正之[2]、奥田 将生[1,2] ([1]広大生物圏、[2]酒総研)
○ Takamasa SHIMODA[1], Masayuki TAKAHASHI[2], Masaki OKUDA[1,2] ([1]Hiroshima Univ., [2]NRIB)

(背景と目的)

清酒醸造において清酒のコクや味わいを付与するため伝統的な生酛系酒母がしばしば用いられる。しかし、生酛系酒母の製造は微生物管理が難しく、製造場ごとにノウハウが必要とされる。

一般的に生酛系酒母ではもろみ初期に硝酸還元菌が生育し一時的に亜硝酸濃度の増加が見られ、その後、乳酸菌が生育し乳酸濃度が増加する。これらの成分は硝酸還元菌や乳酸菌を含むもろみ初期の微生物叢の変化に影響されると考えられているが、その影響については未だ不明な点が多い。そこで本研究では、生酛系酒母を安定的に製造するための条件を見出すことを目的として、PCR-DGGE 法を使用して生酛のもろみ初期の微生物叢を解析し、成分変化との関連性を調べた。

(方法)

原料由来の微生物が生酛製造中の微生物叢の変遷にどの程度影響を与えるか検討する為、（1）麹・蒸米は同一で微生物叢の異なる仕込水を用いた仕込み、（2）仕込水、蒸米は同一で微生物叢の異なる麹を用いた仕込みで生酛を製造した。経時的にサンプリングした生酛は 100 μL 孔径のセルストレーナーで米を除去し、得られた液部から DNA を抽出した。16S rDNA をターゲットにして細菌用ユニバーサルプライマーを用いた PCR を行った。DNA 増幅産物を DGGE システムで電気泳動し、シーケンスにかけて DNA 塩基配列を決定した。BLAST で相同性解析を行い、菌種を推定した。

(結果)

仕込水として水道水、ミネラルウォーター、湧水、井戸水を使用して生酛を製造し、その成分変化及び微生物叢の変遷を比較した。その結果、仕込水の微生物叢には多様性が見られ、生酛での乳酸及び亜硝酸の生成パターンは仕込水によって異なった。しかし、生酛中の微生物叢は仕込水の微生物叢を反映せず類似していた。従って、生酛系酒母の微生物叢に及ぼす仕込水の影響は大きくない可能性が示唆された。

現在、微生物叢の異なる麹を用いて生酛を製造し、生酛系酒母の微生物叢に及ぼす麹の影響を解析している。

kimoto, Bacterial composition, dgge

発表責任者：奥田　将生（sakeoku@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：2C23p14
講演日時：3 月 18 日 17:35～ C 校舎 23 会場

# 希少糖 D-Psicose が酢酸菌 *Acetobacter aceti* の酢酸発酵に及ぼす影響

# Effect of D-Psicose on acetic fermentation by *Acetobacter aceti*

○吉田 大地、小川 綾子、小川 雅廣、早川 茂（香大院農）
○Daichi YOSHIDA, Ayako OGAWA, Masahiro OGAWA, Shigeru HAYAKAWA (Kagawa Univ.)

**1. 目的：**希少糖 D-Psicose（Psi）は D-Fructose の C-3 エピマーであり、食後血糖値上昇抑制、抗う蝕作用といった健康機能を有している。10%Psi を 5%エタノール（EtOH）と共存させて酢酸菌 *Acetobacter aceti*（NBRC14818）に酢酸発酵をさせると、発酵の阻害が見られた。この発酵阻害の主な原因は、菌自体の生育が阻害されることとエタノールの存在下でも PQQ-ADH が不活性型の状態で存在していることであると推察された。そこで、本研究では①Psi がなぜ菌の生育を抑制するのかと②Psi がなぜ EtOH の存在下で PQQ-ADH の活性化を阻害するのか、この 2 つについて調べた。

**2. 方法：**①*A. aeti* の生育阻害メカニズム：Psi 同様に *A. aceti* の生育阻害及び発酵阻害が D-Glucose（Glc）においても見られた。Glc 存在下では TCA 回路の補充経路であるグリオキシル酸回路に関わる 2 つの酵素、Isocitrate lyase（*aceA*）、malate synthase（*glcB*）の遺伝子の発現量が低下することが報告されている [1]。そのため、5%EtOH+10%Psi または 5%EtOH+10%Glc で培養した *A. aceti* の *aceA*、*glcB* の発現量をリアルタイム PCR によって調べた。

②PQQ-ADH 活性化阻害メカニズム：D-Sorbitol（Sor）存在下で *A. aceti* は PQQ-ADH を不活性型から活性型へと変換する [2]。そこで、不活性型 PQQ-ADH を形成した *A. aceti* を Sor とともに Psi を加えて培養し、Sor による不活性型 PQQ-ADH の活性型への変換に Psi が及ぼす影響を調べた。実験としては 1%Sor +5%Psi または 5%Glc で 4h 培養し､培養前後での PQQ-ADH の活性を測定した。

**3. 結果：**①*A. aceti* の生育阻害メカニズム：EtOH+Glc で培養した *A. aceti* の *aceA*、*glcB* の発現量は EtOH の時よりも高かった。一方、EtOH+Psi での *aceA*、*glcB* の発現量は EtOH のみの時とほぼ同じであった。Glc は *A. aceti* のグリオキシル酸回路へ影響を与えることが報告されている [1]。Psi 存在下でも *aceA*、*glcB* の発現量に変化が無かったことから、Psi はグリオキシル酸回路には影響しないことが考えられた。

②PQQ-ADH 活性化阻害メカニズム：Sor+Glc 存在下では培養後、Sor のみの時と同様に PQQ-ADH は活性型へと変換していた。しかし、Sor+Psi 存在下では PQQ-ADH の活性型に変換されていなかった。このことから Psi では PQQ-ADH の活性化を阻害することが考えられた。

これらの結果から Psi と Glc は *A.aceti* に与える影響が異なることが示唆された。

1) K. Sakurai *et al.* 2010: Microbiology.
2) K. Matsushita *et al.* 1995: Journal of Bacteriology.

Rare Sugar, D-Psicose, *Acetobacter aceti*

発表責任者：吉田大地（5.daichi.0817@gamil.com）

講演番号：2C23p15
講演日時：3 月 18 日 17:50～ C 校舎 23 会場

アスパラギン酸脱炭酸活性を有する耐塩性乳酸菌の分離と魚醤油発酵スターターとしての利用
Isolation of halophilic lactic acid bacteria possessing L-aspartate decarboxylase and application to fish sauce fermentation starter

○脇中 琢良[1]、岩田 聡実[1]、渡部 潤[1]、月岡 祐一郎[1]、柴田 由起[2]、木村 メイコ[3]、福井 洋平[3]、里見 正隆[3] ([1]ヤマサ醤油、[2]ブレッシングフェバー、[3]水産機構中央水研)
○ Takura WAKINAKA[1], Satomi IWATA[1], Jun WATANABE[1], Yuichiro TSUKIOKA[1], Yuki SHIBATA[2], Meiko KIMURA[3], Youhei FUKUI[3], Masataka SATOMI[3] ([1]YAMASA Corporation, [2]BlessingFavour Co.,Ltd., [3]National Research Institute of Fisheries Science, Japan Fisheries Research and Education Agency)

【目的】発酵食品の醸造に関与する乳酸菌は、糖・アミノ酸・有機酸等の代謝経路に多様性があり、製品の風味・品質に大きな影響を及ぼす。魚醤油の発酵に寄与する耐塩性乳酸菌の一部の株は、アミノ酸の脱炭酸活性を有しており、ヒスチジン・チロシンなどの脱炭酸によってヒスタミン・チラミンといった有害な生理活性アミンを生成する一方、アスパラギン酸を脱炭酸することでアラニンを生成する株もある。酸味を呈するアスパラギン酸を、甘味を呈するアラニンに変換する反応を利用すれば、ワイン醸造におけるマロラクティック発酵と同様に、魚醤油の風味をまろやかにすることができるのではないかと期待された。そこで、アスパラギン酸脱炭酸活性をもつ菌株を探索し、魚醤油スターターとしての適性を検討した。
【結果】ニギス魚醤油諸味および糠イワシから、計 74 株のアスパラギン酸脱炭酸活性を有する菌株を分離した。全ての株は *Tetragenococcus halophilus* であると推認され、ヒスチジン・チロシン脱炭酸酵素遺伝子 (*hdcA*・*tdcA*) を保持しないことを PCR により確認した。アスパラギン酸脱炭酸酵素遺伝子 (*aspD*) がコードされたプラスミドの構造に基づいて全株をタイピングし、互いにタイプの異なる 16 株を選抜した。選抜した株は魚醤油培地で良好な増殖性を示し、アスパラギン酸をアラニンへ変換することも確認された。
　更にこれらの株をスターターとして魚醤油を試醸した。魚醤油諸味中でもアミノ酸の変換は行われ、[アスパラギン酸濃度：アラニン濃度 (mg/ml) ]は、アミノ酸脱炭酸活性を有しない対照株添加区で[4.1：3.4]だったのに対し、試験区では[ND-0.6：5.6-6.7]となった。また、スターター非添加区では、野生の悪玉乳酸菌によると思われるヒスチジン等の分解が認められたのに対し、スターター添加区ではこれらの現象は抑制された。したがって、本研究で取得した菌株は、魚醤油の品質を向上するものであることが示された。試験株のうち、特に結果が良好であった株については魚醤油の実製造に使用し、更なる評価を行う。
　また、選抜した 16 株について、*aspD* がコードされたプラスミド全長の DNA シーケンス解析を実施したところ、既に報告のある *hdcA*・*tdcA* がコードされたプラスミドの DNA 配列と類似性が認められ、これらのプラスミドと同様の起源を持ち、異なる株間でプラスミドが伝播していることが示唆された。

fish sauce, *Tetragenococcus halophilus*, L-Aspartate decarboxylase

発表責任者：脇中琢良（wakinaka@yamasa.com）

講演番号：2C23p16
講演日時：3 月 18 日 18:05～ C 校舎 23 会場

# イオンビーム変異誘導法による Cellulase 分泌耐熱性 Ethanol 生産糸状菌の構築

Construction of thermotolerant ethanol-producing fungi for CBP by ion-beam mutation

○山下 聖樹[1]、高野 真希[1]、畑下 昌範[2]、星野 一宏[1] ([1]富大院理工、[2]若狭湾エネ研)
○Satoki YAMASHITA[1], Maki TAKANO[1], Masanori HATASHITA[2], Kazuhiro HOSHINO[1] ([1]Univ. Toyama, [2]WERC)

**【目的】**変異誘導技術のひとつに放射線照射法がある。放射線照射には特別な装置が必要であるが、点突然、欠損、挿入変異を生じやすく狭い範囲の変異が特徴である。一方新規な放射線変異法であるイオンビーム照射は通常な変異のみならず高頻度で欠失変異を生じさせることができ、代謝全般を大きく改質できることから近年注目されている。一方我々は以前より、未利用バイオマスからの Ethanol 生産技術として糖化発酵同時進行(CBP)に注目している。CBP は同時糖化発酵(SSF)と異なり、加水分解酵素を菌体自ら分泌し、直接 Ethanol 生産を可能とする技術である。この研究開発の一端としてコストの削減を目指し、耐熱性 Ethanol 生産菌の育種を進めており接合菌 *Rhizopus microspores* が 40℃以上で増殖および Ethanol 生産が可能であることを見出した。そこで本研究ではイオンビーム照射を用いた本菌株の変異誘導を行い Cellulase 分泌耐熱性 Ethanol 生産糸状菌の構築を検討した。
**【方法・結果】**本研究では *R.microspores* NBRC100014 株を使用した。変異誘導は若狭湾エネルギー研究センターにてカーボンイオンビーム(LET：42.0 KeV/μm)照射強度 2,500 Gy で菌懸濁液に照射することで実施した。一次スクリーニングとして熱耐性および Cellulase 分泌向上株の獲得のため α-Cellulose 寒天培地で 50℃静置培養を行った結果、Cellulase を分泌生産し増殖できた 14 株の変異株を取得できた。次に二次スクリーニングとして 40℃での発酵試験を行い 2 株(A, B)を得た。50 g/L Glucose を含む液体培地にて 40 および 45℃、好気または嫌気振盪培養を 96 h 行った結果、40℃では A 株は好気条件下で 17.9 g/L の Lactic acid を生産した。一方 B 株は好気では Lactic acid を生産できなかったが、嫌気条件下では 22.9 g/L の Ethanol を生産した。この結果からイオンビーム照射により同じ親株より Lactic acid 生産株および Ethanol 生産株を獲得できることがわかった。さらに 45℃、嫌気条件下では B 株は親株より 2.3 倍の生産性を示し、15.8 g/L の Ethanol を生産した。以上の結果より高温 CBP による Ethanol 生産のため B 株を選択した。40℃における親株の Ethanol 耐性は 22.9 g/L に対し B 株は 24.4 g/L と若干向上できた。イオンビームによる変異によって熱耐性、Ethanol 耐性および発酵効率が向上した耐熱性 Ethanol 生産変異株の構築ができた。現在 Cellulase 分泌向上株の育種を行っている。

ion-beam, *Rhizopus*, ethanol

発表責任者：星野一宏（khoshino@eng.u-toyama.ac.jp）

講演番号：2C24a01
講演日時：3 月 18 日 09:20～ C 校舎 24 会場

大腸菌の新規プトレッシン排出タンパク SapBCDF の同定
Identification of a novel putrescine exporter SapBCDF of *Escherichia coli*.
○杉山 友太[1]、中村 篤央[2]、松本 光晴[2]、神戸 亜也香[3]、阪中 幹祥[1]、東 恭平[4]、五十嵐 一衛[5]、片山 高嶺[1,6]、鈴木 秀之[3]、栗原 新[1]([1]石川県大、[2]協同乳業、[3]京都工繊大院応生、[4]千葉大院薬、[5]アミンファーマ、[6]京大院生命)
○ Yuta SUGIYAMA[1], Atsuo NAKAMURA[2], Mitsuharu MATSUMOTO[2], Ayaka KANBE[3], Mikiyasu SAKANAKA[1], Kyohei HIGASHI[4], Kazuei IGARASHI[5], Takane KATAYAMA[1,6], Hideyuki SUZUKI[3], Shin KURIHARA[1] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]Kyodo Milk., [3]Kyoto Institute of Technology., [4]Chiba Univ., [5]Amine Pharma., [6]Kyoto Univ.)

**【背景】**腸管内に数 100 μM の濃度で存在し、宿主の健康に重要な影響を与えているポリアミン（PA）は腸内細菌が生産し、放出したものであることが報告されている。腸内細菌の一種である大腸菌ではこれまでに酸性ストレスに応答する PA 放出系 PotE が報告されてきたが、我々は中性の生育条件においても大腸菌が PA の一つであるプトレッシン（Put）を細胞外に放出することを見出した。そこで、本研究では中性の生育条件で機能する大腸菌の新規 Put 排出タンパクの同定を行った。
**【方法・結果】**新規 Put 排出タンパクのスクリーニングは Put 排出タンパク欠損株の培養上清中の Put 濃度が野生株と比べ低くなると仮定して行った。すなわち、Keio コレクションより入手した物質輸送に関わる遺伝子の破壊株 123 種（実験的に機能同定されたものおよびアノテーションのみのものの合計）について、pH 7 の M9＋トリプトン培地で培養した際の培養上清中の Put 濃度を測定し、野生株と比較した。この結果、 *sapD* と *sapF* が Put 排出タンパクもしくはその一部をコードしていると推定された。次に *sapD* と *sapF* が属する推定 *sapABCDF* オペロンについて解析を行ったところ SapBCDF が Put 排出タンパクであると予想された。SapBCDF が Put 排出タンパクであることを証明する目的で安定同位体標識アルギニンが細胞内に取り込まれ、代謝されて生成した安定同位体標識 Put の培養上清中の濃度を測定することで、SapBCDF を介して細胞内から細胞外に Put が放出されているのか検討した。この結果、培養上清中の $OD_{600}$ あたりの安定同位体標識 Put 濃度が親株で 21.9 μM であったのに対し、Δ*sapBCDF* 株は 8.3 μM、*sapBCDF* 相補株は 16.9 μM であったことから、SapBCDF は Put 排出タンパクであることが示された。ところで、SapABCDF は *Salmonella enterica* sv. Typhimurium 等の病原性細菌において抗菌ペプチド（AMP）耐性への寄与が報告されている[1)]。そこで、大腸菌の SapBCDF が AMP 耐性に寄与しているか検討したが、*sapBCDF* 欠損による AMP 耐性能の低下は認められなかった。
**【結論】**中性の生育条件で機能する大腸菌の新規 Put 排出タンパクの一つとして SapBCDF を同定した。SapBCDF は PA 輸送系として世界初の ABC エクスポーターであり、腸管内での PA 産生への寄与が示唆された。大腸菌において SapBCDF は AMP 耐性に寄与していないことが示唆された[2)]。
**【謝辞】**本研究は公益財団法人 発酵研究所（IFO）の寄付講座助成の研究成果である。本成果の一部は生研センター・イノベーション創出基礎的研究推進事業の助成により行われた。
1) Parra-Lopez *et al.* (*EMBO J,* **12**,4053-4062, 1994). 2) Sugiyama *et al.* (*J Biol Chem*, in press)

putrescine, polyamine exporter, polyamine

発表責任者：栗原 新（kuri711@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：2C24a02
講演日時：3 月 18 日 09:35～ C 校舎 24 会場

好熱菌発酵産物を給与した採卵鶏における腸内乳酸菌叢内の変化
Administration of thermophile-fermented compost modulates predominant lactic-acid bacterial flora in feces of laying hens

○青井 洋太[1]、吉川 翔太[1]、須田 亙[2,5]、井藤 俊行[4]、小野瀬 曉[4]、服部 正平[5,6]、宮本 浩邦[1,2,3]、児玉 浩明[1] ([1]千葉大・融合、[2]慶応大・医、[3]サーマス、[4]京葉プラントエンジニアリング、[5]東京大院・新領域、[6]早大先進理工)
○Yota AOI[1], Shota Yoshikawa[1], Wataru Suda[2,5], Toshiyuki Ito[4], Akira Onose[4], Masahira Hattori[5,6], Hirokuni Miyamoto[1,2,3], Hiroaki Kodama[1] ([1]Chiba Univ., [2]Keio Univ., [3]Sermas Co.,Ltd, [4]Keiyo Plant Engineering Co.,Ltd, [5]Tokyo Univ., [6]Waseda Univ.)

海産資源を 70～80℃の高温下で発酵させた飼料(好熱菌発酵産物)は、ニワトリやブタ等に給与されており、採卵鶏に給与した場合、採卵率が上昇する。一方でニワトリ・ブタにおいては好熱菌発酵産物の給与によって排泄糞中の乳酸含量が低下することも報告されており、腸内の乳酸代謝に関わるバクテリアの種類が大きく変化していることが示唆されている。そこで、本研究では、好熱菌発酵産物を 120 日間継続給与した採卵鶏(試験区)と対照区の採卵鶏の新鮮な排泄糞便サンプル(各 n=7)を用いて、排泄糞中の乳酸菌の優先菌株の同定を試みた。乳酸菌選択培地である MRS 培地でコロニーを形成したバクテリアを rep-PCR 解析により分類し、各グループから選抜された代表菌株について 16S rRNA 遺伝子配列による簡易同定を行った。その結果、排泄糞のサンプルによって菌叢のバラツキは大きいものの、傾向として試験区では Lactobacillus 属バクテリア(L. johnsonii, L. vaginalis)が上位２種を占め、対照区では Enterococcus 属バクテリア(E. faecalis, E. casseliflavus)が上位２種を占めていた。また、Enterococcus 属バクテリア２種による in vitro での乳酸産生量を調べると、Lactobacillus 属バクテリア２種によるものより少なかった。以上の解析結果から、採卵鶏において、好熱菌発酵産物の給与はニワトリ腸内乳酸菌の優先種を変化させることが明らかになった。さらに、鶏糞中の 16S rRNA 遺伝子配列の次世代シーケンス解析についても併せて報告する。

gut microbiota, probiotics, lactic-acid bacteria

発表責任者：青井洋太（two_waterpolo@yahoo.co.jp）

講演番号：2C24a03
講演日時：3 月 18 日 09:50～ C 校舎 24 会場

好熱菌発酵産物由来のプロバイオティクス候補菌 *Bacillus coagulans* の代謝特性の解析
Metabolic properties of potentially probiotic *Bacillus coagulans* strains isolated from the thermophile-fermented compost.

○宮本 理菜[1]、吉川 翔太[1]、宮本 浩邦[1,2,3,4]、中西 裕美子[4]、大野 博司[4]、児玉 浩明[1]（[1]千葉大院・融合、[2]日環科学、[3]サーマス、[4]理研 IMS）
○Rina MIYAMOTO[1], Shota YOSHIKAWA[1], Hirokuni MIYAMOTO[1,2,3,4], Yumiko NAKANISHI[4], Hiroshi Ohno[4], Hiroaki KODAMA[1] ([1]Chiba Univ., [2]Japan Eco-science Co., Ltd., [3]Sermas co., ltd, [4]RIKEN, IMS)

海産資源を 70～80 ℃の高温下で発酵させた飼料は、家畜の成長促進、筋肉量の増加、内臓脂肪の減少など様々な生理作用を有する。このメカニズムを解明するために、当該発酵飼料由来の機能性バクテリア候補が単離された（Miyamoto et al., (2013) J. Appl. Microbiol. 114:1147-1157）。その後、単離された 24 株のうち、8 株が *Bacillus coagulans* であると同定されが、rep-PCR 解析や DNA-DNA ハイブリダイゼーションの結果などから、これらの 8 株は N16、T12、T17 の 3 株を代表とする 3 つのグループに分類された。これらの 3 株を BALB/c マウスおよび C57BL/6 マウスに給与すると、宿主の増体率、血清中コレステロール値、腸内細菌叢にそれぞれの株によって特徴的な変化が見られた。本研究では、N16、T12、T17 株およびその標準菌株である *B. coagulans* NBRC 12583$^{T}$ 株の計 4 株の代謝特性を解析することを目的とした。単糖からの有機酸産生能を調べた結果、4 株の主な生成物は乳酸で、その他にプロピオン酸がわずかに検出された。特に、乳酸変換率は 4 株とも 50% を超え、有胞子性乳酸菌であることが明らかになった。そこで、乳酸菌プロバイオティクスとしての効能を推察するために、メタボローム解析などを活用して代謝機能の特性を総合的に評価したので報告する。

*Bacillus coagulans*, compost, probiotics

発表責任者：宮本理菜（acta1239@chiba-u.jp）

講演番号：2C24a04
講演日時：3 月 18 日 10:05～ C 校舎 24 会場

# 根粒菌 *Bradyrhizobium diazoefficiens* 由来レアアース依存的メタノール脱水素酵素の酵素科学的性質

# Enzymatic property of Rare earth elements dependent methanol dehydrogenase from *Bradyrhizobium diazoefficiens*

○菅沼 宗矢[1]、王 倫[1]、日比野 歩美[1]、三井 亮司[2]、谷 明生[3]、海老原 章郎[1]、早川 享志[1]、中川 智行[1] ([1]岐阜大学応生、[2]岡山理大理、[3]岡山大植物研)
○Soya Suganuma[1], Lun Wang[1], Ayumi Hibino[1], Ryoji Mitsui[2], Akio Tani[3], Akio Ebihara[1], Takashi Hayakawa[1], Tomoyuki Nakagawa[1] ([1]Gifu Univ., [2]Okayama Univ. of Sci., [3]Okayama Univ.)

【目的】

マメ科植物の根粒菌のモデル株である *B. diazoefficiens* USDA110 株はそのゲノム上にメタノール脱水素酵素（MDH）のオーソログ遺伝子（*xoxF* [blr 6213]）を持つことが知られている。しかし、USDA110 株がメタノール/Ca 培地に生育できないため、XoxF は十分な MDH 活性を示さないとされてきた[1)]。一方、我々のグループでは USDA110 株がレアアース（REE）依存的にメタノール生育を示すことを見出し、報告している[2)]。REE は *Methylobacterium* 細菌の XoxF の補因子であり、本細菌群が REE 依存的にメタノール生育を示すことが知られている[3)]。このことは、USDA110 株においても REE がメタノール代謝を司る鍵因子であることが考えられ、XoxF が REE 依存的 MDH である可能性が非常に高い。そこで本研究では *B. diazoefficiens* USDA110 株の持つ REE 依存型 MDH の酵素科学的性質を解明し、根粒菌のメタノール生育における REE の役割を解明することを目的とした。

【方法・結果】

USDA110 株のメタノール生育における REE 依存性を観察したところ、本菌株は La から Nd までの 4 種類の REE 依存的なメタノール生育を示した。一方、メタノール/REE 生育細胞の MDH 誘導を観察したところ、メタノール/Ce 生育細胞が最も高い MDH 活性を示した。そこで、メタノール/Ce 培地に生育した USDA110 株から MDH の精製を試みた。MDH は、硫安沈殿（70%）、Butyl TOYOPEARL 650S および HiTrap SP カラムクロマトグラフィーにて行い、SDS-PAGE にて単一バンドになるまで精製を行った。精製 MDH は 64 kDa のサブユニットからなる単量体で、PMF 解析により *xoxF* にコードされることが明らかとなった。また、XoxF は補因子として Ce を保持しており、最適温度は 35ºC であった。メタノールに対する $K_m$ 値は 67.2 μM、$V_{max}$ は 12.9 U/mg であった。この結果は *M. extorquens* AM1 由来の Nd-MDH とほとんど同じ性質であり、USDA110 株の XoxF も REE 依存的 MDH として機能することで、本株のメタノール生育を担っていることが示された。よって、根粒菌は自然界において REE を用いることでメタノール生育が可能であり、REE 依存型メタノール代謝は根粒菌や *Methylobacterium* 細菌などの植物共生細菌にとって重要な役割を持つものと考えられる。

[1)] Sudtachat N. *et al*., *Appl Environ Microbiol*. 2009. 75:5012-5017.
[2)] 三井 亮司ら, 日本農芸化学会 2013 年大会要旨集. 講演番号：3B21a11.
[3)] Nakagawa T. *et al*., *PLoS One*. 2012. 7:e50480.

*Bradyrhizobium diazoefficiens*, methanol dehydrogenase, rare earth elements

発表責任者：中川 智行（t_nakaga@gifu-u.ac.jp）

講演番号：2C24a05
講演日時：3 月 18 日 10:20～ C 校舎 24 会場

*Pichia methanolica* の高メタノール生育阻害は代謝中間体ホルムアルデヒドに起因する
Formaldehyde, intermediate in the methanol metabolism, is a primary cause of growth inhibition of *Pichia methanolica* at high methanol level
○土井 遼平、若山 敬嗣、蓮實 涼子、早川 享志、中川 智行（岐阜大応生）
○ Ryohei DOI, Keishi WAKAYAMA, Ryoko HASUMI, Takashi HAYAKAWA, Tomoyuki NAKAGAWA (Gifu Univ.)

【背景】
メチロトローフ酵母 *P. methanolica* は、アルコール酸化酵素（AOD）をはじめとした強力なメタノール誘導性遺伝子を有し、それらのプロモータを用いた異種遺伝子発現系は、現在、広く利用されている。一方、メチロトローフ酵母は高濃度メタノール環境下において強い生育阻害を示すことが知られており [1]、本性質はメタノールを出発原料とした本酵母の発酵生産系構築において障害となっている。これまで私たちのグループでは、メチロトローフ酵母の高メタノール環境下における生育阻害の原因のひとつが細胞内に過剰に蓄積した代謝中間体であるホルムアルデヒド(FA)にあると推測し、研究を行ってきた。今回、*P. methanolica* の高濃度メタノール環境下における代謝中間体 FA の毒性が生育に与える影響を明確にすることを目的とした。
【結果および考察】
私たちはすでに、*P. methanolica* がメタノール生育初期に培地中に FA を蓄積し、その消費と共に対数増殖期に移行することを示している [1]。*P. methanolica* は 5%メタノール平板培地では全く生育できないが、メタノール代謝系の発現が完全に抑制される 5%メタノール/Glc 平板培地には生育可能であった。つまり、メタノール代謝系が抑制されることでメタノール生育阻害が解消されると考えられる。そこで、*P. methanolica* のグルコース抑制解除株を作成し、その高メタノール生育について解析を行うことにした。*P. methanolica* のランダム変異株から 2-DG 耐性によりグルコース抑制解除株を選抜し、RH3 株と命名した。RH3 株は、1%メタノール/Glc 培地で生育した場合、十分なメタノール代謝関連酵素活性を持ち、AOD アイソザイムも 9 本全て誘導されていた。これらのことから、RH3 株のグルコース抑制は遺伝的に解除されていることが示された。次に、RH3 株と野生株の高メタノール平板培地における生育を比較したところ、5%メタノール培地ではどちらも生育できなかったが、5%メタノール/Glc 培地においては RH3 株は生育阻害を示したのに対し、野生株は十分な生育が観察された。つまり、RH3 株ではグルコース抑制が解除されているため、メタノール代謝が進み、FA が細胞内で生産されることにより、生育が阻害されたと考えられる。
これらの知見は、*P. methanolica* の高メタノール生育阻害の要因はメタノール自身の毒性よりも、代謝に伴い蓄積される代謝中間体 FA の細胞内毒性が主要要因であることが示された。
1) Wakayama K, *et al.*, *J Biosci Bioeng*. 2016. 122:545-549.

*Pichia methanolica*, formaldehyde, glucose repression

発表責任者：中川 智行（t_nakaga@gifu-u.ac.jp）

講演番号：2C24a06
講演日時：3 月 18 日 10:45～ C 校舎 24 会場

ヒト腸内細菌 *Bacteroides thetaiotaomicron* のポリアミン代謝・輸送系の解明
Elucidation of polyamine metabolism/transport systems in *Bacteroides thetaiotaomicron*
○阪中 幹祥[1]、杉山 友太[1]、片山 高嶺[1,2]、栗原 新[1] ([1]石川県大、[2]京大生命)
○ Mikiyasu SAKANAKA[1], Yuta SUGIYAMA[1], Takane KATAYAMA[1,2], Shin KURIHARA[1] ([1]Ishikawa Prefectural Univ., [2]Kyoto Univ.)

【背景・目的】
プトレッシン，スペルミジン，スペルミンを代表とするポリアミンはほぼ全ての生物の生体内に存在しており，生物の増殖，成長，健康に大きく寄与している．ヒトの大腸腸管内腔においても数百 μM のポリアミンが含まれており，それらのポリアミンは主に腸内細菌によって代謝・輸送されたものであると考えられている．これまで，腸内細菌のポリアミン代謝・輸送系の解析は非優占種である大腸菌を中心に進められてきたが，本研究ではヒト腸内細菌最優占種の一種 *Bacteroides thetaiotaomicron* のポリアミン代謝・輸送機構について詳細な理解を得ることを目的とした．

【方法・結果】
*B. thetaiotaomicron* のポリアミン代謝・輸送系を Blast 解析により調査したところ，本菌はカルボキシスペルミジンを介したスペルミジン代謝系とスペルミジン取込み系を有することが推定された（Fig.）[(1)]．続いて，推定スペルミジン代謝系遺伝子の機能を検証するために，各遺伝子（*N*-carbamoylputrescine amidohydrolase をコードする *ncpah*，carboxyspermidine dehydrogenase をコードする *casdh*，carboxyspermidine decarboxylase をコードする *casdc*）の欠損株をそれぞれ作出し，ポリアミンを含まない最少培地で培養した親株と各欠損株のポリアミンプロファイルを HPLC により解析した．その結果，ポリアミンとしてスペルミジンのみを菌体内に蓄積した親株とは対照的に，各欠損株はスペルミジンを蓄積せず中間体であるアグマチンを産生することが明らかになった．さらに，推定スペルミジン取込み系の機能を調査するために *potABCD* 欠損株を作出した．*potABCD* 欠損株と親株をスペルミジンを含む培地で培養し，HPLC 解析に供したところ，*potABCD* 欠損株は親株よりもスペルミジン取込み能が低下していることが示された．以上より，*B. thetaiotaomicron* において *ncpah*，*casdh*，*casdc* はスペルミジン代謝に，*potABCD* はスペルミジンの取込みに寄与していることが明らかになった．これらの遺伝子のホモログは多数の腸内細菌が有するので，今回得た知見は腸内細菌のポリアミン代謝・輸送系を理解するうえで重要である．

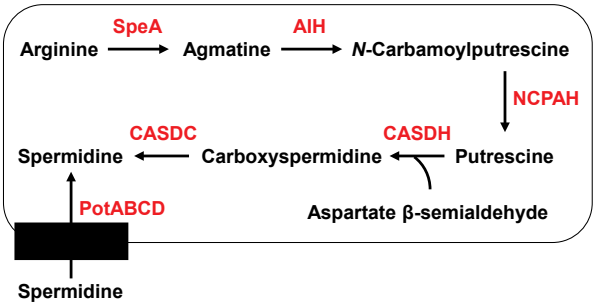


**Fig.** Predicted polyamine biosynthetic pathway and polyamine transport system in *B. thetaiotaomicron*

(1) Sakanaka *et al.*, *Amino Acids* (2016) 48:2443–2451

polyamine, spermidine, *Bacteroides thetaiotaomicron*

発表責任者：栗原 新（kuri711@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：2C24a07
講演日時：3 月 18 日 11:00～ C 校舎 24 会場

大腸菌におけるピリドキサール-5’-リン酸の恒常性における脱リン酸化酵素 YbhA の役割
Role of the YbhA phosphatase in pyridoxal 5'-phosphate (PLP, vitamin $B_6$) homeostasis in *Escherichia coli*

○杉本 良太[1,2]、斎藤 菜摘[3,4]、島田 友裕[1]、田中 寛[1,2]（[1]東工大化生研、[2]東工大総、[3]鶴岡高専、[4]慶応大学）
○Ryota SUGIMOTO[1,2], Natsumi SITOH[3,4], TOMOHIRO SHIMADA[1], Kan TANAKA[1,2] ([1]Chem. & Life Sci., [2]Tokyotech., [3]Tsuruoka-nct., [4]Keio univ.)

Vitamin $B_6$（Pyridoxal 5’-phosphate ( PLP ) ）はアミノ酸代謝に関与する酵素活性に極めて重要な補酵素である。従って、PLP の欠乏が引き起こす影響については研究が進んでいるが、PLP の蓄積が及ぼす影響に関しては未解明な部分が多い。そこで、本研究ではモデル生物大腸菌を用いた解析を行った。

まず、PLP 過剰蓄積が細胞増殖に与える影響を検証するため PLP 前駆体である Pyridoxal（PL ）を培養液へと添加し、大腸菌野生株の増殖測定を行った。その結果、添加する PL 濃度に依存して増殖が阻害される現象を発見した。この結果は、PL 添加が細胞増殖に対して毒性を示すことを示唆している。*in vitro* screening 系を用いた先行研究（Kuznetsova et al., 2006, J. Biol. Chem.）により、大腸菌は PLP phosphatase 活性を示す酵素（YbhA、Cof、YigL）を有することが報告されていたが、これら酵素の生理的機能は未知であった。そこで、PL 添加条件下でこれらの遺伝子を過剰発現した際の増殖測定を行ったところ、YbhA 過剰発現株においてのみ PL 添加による増殖阻害が緩和されることを見出した。また、YbhA 過剰発現は増殖阻害を示したが、この表現型が PL の添加により抑圧された。これらの結果は、YbhA 過剰発現株が示す増殖阻害が PLP 欠乏に起因したものであり、また、YbhA が細胞内において PLP phosphatase として機能することで PLP の蓄積を緩和し、ホメオスタシスの維持に関与したことを示唆している。さらに、ゲノム上の *ybhA* 遺伝子の PLP ホメオスタシスへの寄与を検証するために、*ybhA* 欠損株において PL kinase である PdxK を過剰発現することで PLP 蓄積を誘起したところ、増殖阻害が引き起こされたことを確認した。

PLP を補酵素として必要とする酵素はアミノ酸代謝関連に多くみられるため、PLP の蓄積による増殖阻害はアミノ酸代謝異常に起因すると考えられた。そこで、カザミノ酸含有培地において PL 添加における増殖を測定したところ、PLP 蓄積に由来する増殖阻害が抑圧された。さらに、メタボローム解析により PLP 蓄積時にアミノ酸代謝の異常が引き起こされたことが観察された。これらの結果は、正常なアミノ酸代謝には適正な PLP 濃度が重要であることを示唆している。

これらの結果を統合して、本発表では PLP ホメオスタシスにおける YbhA の役割について提案したい。

*Escherichia coli*, Pyridoxal 5'-phosphate, amino acids metabolism

発表責任者：田中寛（kntanaka@res.titech.ac.jp）

講演番号：2C24a08
講演日時：3 月 18 日 11:15～ C 校舎 24 会場

*Acidomonas* 属酢酸菌のレアアースに対する応答
Response to rare earth element of methylotrophic acetic acid bacterium, *Acidomonas methanolica*
○宇都宮 大貴[1]、山本 麻衣子[1]、三井 亮司[2]、阿野 嘉孝[1] ([1]愛媛大院農・生命機能、[2]岡山理大理)
○Daiki UTSUNOMIYA[1], Maiko YAMAMOTO[1], Ryoji MITSUI[2], Yoshitaka ANO[1] ([1]Ehime Univ., [2]Okayama Univ. of Sci.)

【背景】*Acidomonas methanolica* は、メタノール資化能をもった酢酸菌の一種で、ピロロキノリンキノン（PQQ）依存性のメタノール脱水素酵素（MDH）やアルコール脱水素酵素（ADH）、グルコース脱水素酵素（GDH）などがペリプラズム空間で基質を酸化して、エネルギー代謝の初発酸化反応として機能している。本菌のゲノム上には MDH として、PQQ の結合に $Ca^{2+}$を補因子とする MxaF と、レアアースである $La^{3+}$を補因子とする XoxF の存在が確認されている。これまでに、*Methylobacterium extorquens* など多くのメチロトローフ細菌が、$La^{3+}$存在下での生育において高い MDH 活性を誘導するなど、レアアースに対して特徴的な応答を示すことが明らかにされている (1)。しかしながら、レアアースに対する微生物応答の報告はメタノール代謝に限定されており、その他の代謝系との関係は不明な点が多い。本研究では、レアアースに対する微生物応答をより広く理解するために、メタノールに加えて、酢酸菌生育に好適なエタノール、グリセロール、グルコースを使用して、*Ac. methanolica* MB58 に $La^{3+}$が及ぼす影響を調査した。

【方法・結果】本菌をメタノールで生育させると、$La^{3+}$添加条件（La+）で生育の低下が見られ、MDH 活性が顕著に減少し、*M. extorquens* AM1 での報告(1)とは異なる結果となった。しかし、SDS-PAGE で解析したところ、La+では MxaF の発現が抑制され XoxF が発現していたことから、既報(1)と同様に $La^{3+}$が MDH の発現を誘導していることが示唆された。このことは、本菌の La+での MDH 活性がメタノールに対して非常に高い Km 値を示すことから説明できた。炭素源がエタノール、グルコースの場合では生育に大きな影響は見られなかったものの、グリセロールを用いた際には生育の大幅な低下が見られ、$La^{3+}$がグリセロールでの生育を阻害していることが示唆された。また、いずれの炭素源でも La+では ADH の発現が抑制されることが分かった。これらの結果は、*Ac. methanolica* には、他のメチロトローフ細菌とは異なるレアアースによる制御系が存在することを示すものである。現在、これら $La^{3+}$による発現調節の生理的機能を探るべく、変異株の解析を進めている。

（1）Nakagawa et al., (2012) PloS one, 7(11), e50480.

Methylotrophs, Rare earth elements, Methanol dehydrogenase

発表責任者：阿野嘉孝（anoy@agr.ehime-u.ac.jp）

講演番号：2C24a09
講演日時：3 月 18 日 11:30～ C 校舎 24 会場

根圏細菌 *Pseudomonas putida* における DOPA 脱炭酸酵素の発現調節因子の同定
Transcriptional regulator of DOPA decarboxylase gene in *Pseudomonas putida*
○谷内 寛之[1]、那須 駿太[1]、中川 明[1]、栗原 新[1]、片山 高嶺[1,2]、小柳 喬[1] ([1]石川県大生資環、[2]京大生命)
○ Hiroyuki YACHI[1], Syunta NASU[1], Akira NAKAGAWA[1], Shin KURIHARA[1], Takane KATAYAMA[1,2], Takashi KOYANAGI[1] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]Kyoto Univ.)

植物は根を通して、周辺に生息する他種生物の生育を促進または抑制する化学物質（アレロケミカル）を産生することで、根の周囲環境（根圏）を調整している。特に、マメ科植物ムクナ（*Mucuna pruriens*）をはじめとする植物が産生する芳香族アミノ酸 3,4-ジヒドロキシ-L-フェニルアラニン（L-DOPA）は、雑草の生育を抑制する強力なアレロケミカルとして知られる。

これまで我々は、根圏細菌 *Pseudomonas putida* KT2440 から L-DOPA に極めて特異性の高い L-DOPA 脱炭酸酵素（DDC）を見出した。一方で、*P. putida* は L-DOPA を合成できないため、おそらく植物が産生した L-DOPA を変換するために DDC を発現し、植物と相互作用を行うことが考えられる。また、*P. putida* の DDC は L-DOPA 存在下でのみ強く発現することから、細菌では報告のない L-DOPA 誘導型転写因子の存在が予想される。そこで本研究では、*P. putida* における新規な L-DOPA 応答性転写因子の同定、解析を試みることで、植物 - 根圏細菌共生メカニズムの一端を解明することを目指した。

まず、*P. putida* のゲノムから *ddc* 転写因子をスクリーニングするために、 *ddc* 上流域をβ-ガラクトシダーゼ（*lacZ*）に連結したレポーター遺伝子を作製した。そのレポーターシステムを導入した大腸菌をホストとして、*P. purida* のゲノムライブラリーを作製し、X-Gal を含む培地にて青色を呈したコロニーを選抜した。青色を呈したコロニー由来のプラスミドをシークエンス解析したところ、*ddc* の上流に並ぶ遺伝子 PP_2550（YebC protein family; Pfam family Transcrip_reg）および PP_2551（LysR family transcriptional regulator）を含む配列が確認された。これら因子が *ddc* の転写調節に関わるかを調べるために、上記遺伝子を両方または片方ずつ発現させた大腸菌を用いて、LacZ 活性（Miller Units [MU]）を測定した。その結果、PP_2550 のみを導入した場合では空ベクターと同様に 1 MU 程度であったのに対し、PP_2551 のみを導入した場合では 12 MU と増大し、L-DOPA 存在下でさらに 300 MU に増大した。これは PP_2551 が、L-DOPA 存在下で機能するアクチベーターであることを示唆している。一方で、PP_2550 と PP_2551 を両方導入した場合では 2 MU、L-DOPA 存在下でも 14 MU であり、いずれも PP_2551 のみの場合より減少した。このことから PP_2550 は、*ddc* または PP_2551 のリプレッサーであると推測される。以上から、細菌における、L-DOPA を介した DDC の新規発現調節機構の一端が明らかとなった。

今後は、これら転写因子の機能を分子レベルで解析するとともに、L-DOPA が *P. putida* - 植物共生においてどのような役割を果たすか解明していく予定である。

*Pseudomonas putida*, dopa, transcription factor

発表責任者：小柳　喬（koyataka@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：2C24a10
講演日時：3 月 18 日 11:45～ C 校舎 24 会場

メタノール培養時に誘導される酵母 *Pichia pastoris* SSS ファミリートランスポーターの機能解析
SSS family transporters induced by methanol in *Pichia pastoris*

○芝田 桃子[1]、大澤 晋[1]、由里本 博也[1]、寶関 淳[1,2]、阪井 康能[1,2] ([1]京大院農、[2]京大・生理化学)
○ MOMOKO SHIBATA[1], SHIN OHSAWA[1], HIROYA YURIMOTO[1], JUN HOSEKI[1,2], YASUYOSHI SAKAI[1,2] ([1]Grad. Sch. Agri., Kyoto Univ., [2]Res. Unit for Physiol. Chem., Kyoto Univ.)

*P. pastoris* は、メタノールを単一の炭素源として生育できる。そのための C1 代謝経路、メタノール誘導性遺伝子発現に関わる転写因子、ならびにメタノール代謝を担うペルオキシソーム形成については、これまで多くの研究が進められてきたが、メタノール代謝に関わる低分子代謝物の細胞内外への輸送やその機構については、ほとんど解明されていない。我々は *P. pastoris* のゲノムにおいて、sodium:solute symporter (SSS)ファミリータンパク質 Sss 1 -Sss4 に着目して研究を進めている。Sss1-YFP は細胞膜に局在し、２つの培養槽が膜で仕切られている別府フラスコを用いたメタノール共培養時に *sss1Δ*株の生育が野生株に比較して強く阻害されたことから、Sss1 がメタノールでの生育に必要な基質を細胞内へ取り込むトランスポーターと予測している[1)]。

本年度は、*P. pastoris* における SSS ファミリートランスポーターの機能解析を目的としてさらなる解析を行った。メタノール代謝における重要な中間体であるホルムアルデヒドの培地中濃度を計時的に測定したところ、メタノール培養時においても、ホルムアルデヒドを含む培地における培養時でも、*sss1Δ*株での培地中のホルムアルデヒド濃度の減少速度は野生型と比べて減少していた。現在、Sss1 の輸送基質の探索を目的として、細胞内のメタノール代謝に関連する代謝物の LC-MS/MS による定量解析を行っている。また Sss1 と同様、Sss2 もメタノール依存的に転写が誘導されていることがわかった。*sss1Δ*株と *sss1Δsss2Δ*二重破壊株の共培養時には、二重破壊株の生育が遅延していた。これらの結果から、Sss2 も、Sss1 と同様メタノールでの培養時に機能するトランスポーターであることが示唆された。

[1)]芝田桃子ら，日本農芸化学会 2016 年度大会講演要旨集　4F042

transporter, methanol, *Pichia pastoris*

講演番号：2C24p02
講演日時：3 月 18 日 14:15～ C 校舎 24 会場

糸状菌 *Talaromyces cellulolyticus* の糖化酵素遺伝子の発現機構の解析
Expression mechanism of cellulase and xylanase genes in *Talaromyces cellulolyticus*
○藤井 達也[1]、井上 宏之[1]、石川 一彦[2]、星野 保[1]([1]産総研・機能化学研究部門、[2]産総研・バイオメディカル研究部門)
○ Tatsuya Fujii[1], Hiroyuki Inoue[1], Kazuhiko Ishikawa[2], Tamotsu Hoshino[1] ([1]Sustainable Chemistry RI, AIST, [2]Biomedical RI, AIST)

糸状菌 *Talalomyces celluolyticus* は、セルラーゼ・ヘミセルラーゼに代表される各種糖化酵素を大量に分泌する。発表者の研究グループでは、これまで本菌の全ゲノム解析や遺伝子組み換えツールの開発を行い、これらを用いて糖化酵素の生産メカニズムの解明に取り組んできた。これまでの解析で、本菌の糖化酵素遺伝子の発現は、他の糸状菌と同様に転写因子 CreA によるカタボライト抑制や転写因子 XlnR による誘導を受けることが明らかとなっている。

今回、全ゲノム情報から糖化酵素遺伝子の発現への関与が予測された推定転写因子遺伝子を 7 個選抜した。これらの遺伝子の遺伝子破壊株を作製し、糖化酵素（セルラーゼ、キシラナーゼ）の生産性を検討した。その結果、*tacA* 遺伝子および *tctA* 遺伝子破壊株の酵素生産性がコントロール株のそれよりも有意に減少していた。*tacA* および *tctA* がコードする推定アミノ酸配列は、それぞれ *Hypocrea jecorina* の Ace1 および *Fusarium solani* の CtfB1 と相同性を示す。さらに、セルラーゼおよびキシラナーゼ遺伝子の発現量を検討したところ、これら遺伝子破壊株の発現量はコントロール株のそれよりも低下していた。以上の結果は他の糸状菌では報告されておらず、本菌特有の転写制御メカニズムの存在を示唆している。

さらに現在、本菌のエンドグルカナーゼ I 遺伝子のプロモーター領域を用いたレポーター解析、および当該プロモーター領域に結合する転写因子のスクリーニングを行っており、新規な転写制御メカニズムの発見が期待される。

*Talaromyces cellulolyticus*, cellulase, transcriptional factor

講演番号：2C24p03
講演日時：3 月 18 日 14:30～ C 校舎 24 会場

*Aspergillus aculeatus* セルラーゼ生産制御機構における SepM の機能解析
Functional analysis of SepM in the regulation of cellulase production in *Aspergillus aculeatus*
○津村 亮輔、谷 修治、炭谷 順一、川口 剛司（阪府大・生環）
○Ryosuke Tsumura, Shuji Tani, Jun-ichi Sumitani, Takashi Kawaguchi (Osaka Pref Univ.)

【目的】*Aspergillus aculeatus* においてセルラーゼ遺伝子の発現誘導は，構成的に微量生産されているセルラーゼが基質に作用し、遊離された誘導物質を認識することにより起きると考えられるが，この分子機構は不明な点が多い。本研究では，セルラーゼ生産調節に関わる新規制御因子の同定とその機能解明を目的とした。【方法・結果】新規制御因子の探索は，orotidine-5’-monophosphate decarboxylase 及び β-glucuronidase の遺伝子をレポーターとして主要セルラーゼ FIII-avicelase (*cbhI*) 遺伝子のプロモーター制御下で独立して発現する宿主を用いて行った。アグロバクテリウム形質転換法により宿主を形質転換し，構築した約 10,000 株の T-DNA 挿入変異株ライブラリから，5-fluoroorotic acid 耐性を獲得及び GUS 活性・セルロース資化能が低下した株を一次候補株として単離した。一次候補株について，サザンブロット解析により T-DNA が 1 コピーで挿入されている株を選択し，qRT-PCR 解析により，アビセル誘導条件において *cbhI* 転写量が宿主に比べ減少している株を最終候補株 no.12 株とした。inverse PCR 法により，no.12 株染色体上の T-DNA 周辺配列を増幅し，シークエンス解析により T-DNA 挿入領域を特定した。T-DNA が *Schizosaccharomyces pombe cdc14* に相同な *sepM* 遺伝子の上流に挿入されていた事から, *cbhI* 発現量の減少が *sepM* の機能低下もしくは欠失に起因していると考え，相同組み換え法を用いて *sepM* 単一破壊株及び *sepM* 相補株を作製し解析に用いた。解析の結果，*sepM* 破壊株においてアビセル誘導条件における *cbhI* 発現量がコントロール株に比べ 20%程度に低下しており，この発現量の低下は *sepM* 相補により回復した。また *cbhI* 遺伝子以外の多くのセルラーゼ・ヘミセルラーゼ遺伝子の発現もコントロール株と比較すると *sepM* 破壊株において 50%から 20%程度まで低下していた。更に興味深い事に，FI-avicelase (*cbhII*) 遺伝子の発現量は 5%程度にまで低下し、セルロースに応答した誘導発現が消失していた。さらなる解析の結果，*cbhII* はセルラーゼ転写活性化因子 ManR の制御下で発現している事，*sepM* 破壊株における *manR* 転写量がコントロール株に比べて 20%程度まで減少している事を明らかにした。これらの結果より，SepM は，ManR を介した遺伝子発現制御に直接的もしくは間接的に作用する事で，*cbhII* 発現を制御していることが示唆された。以上の事から, 本研究により, *A. aculeatus* におけるセルラーゼ生産制御機構に SepM が関与する事を見出し，SepM を加えた新たな制御機構のモデルを提唱する。現在は，*sepM* 高発現株を作製し，転写レベル，酵素レベルでの影響を解析中である。

aspergillus aculeatus, cellulase, gene regulation

講演番号：2C24p04
講演日時：3 月 18 日 14:45～ C 校舎 24 会場

*Aspergillus aculeatus* の SR protein-specific kinase F が関わる情報伝達経路の遺伝学的解析
Genetic analyses of signal transduction associated with *Aspergillus aculeatus* SrpkF
○片山 椋平、谷 修治、炭谷 順一、川口 剛司 (阪府大院生環)
○Ryohei KATAYAMA, Shuji TANI, Junichi SUMITANI, Takashi KAWAGUCHI (Osaka Pref. Univ.)

【目的】糸状菌 *Aspergillus aculeatus* は糖化力に優れた種々のセルラーゼ・ヘミセルラーゼを分泌生産する能力を有しており、セルロース系バイオマスの酵素糖化への応用が期待されている。これらの酵素を産業利用するためには、セルラーゼ遺伝子の発現制御機構を解明し酵素の大量生産系を確立することが求められる。本研究では、*A. aculeatus* における新規なセルラーゼ遺伝子発現制御因子の同定とその機能解明を目的としている。
【方法・結果】これまでに *A. aculeatus* T-DNA 挿入変異株ライブラリーからセルロース資化能が低下した株（Q3）を単離していた。そこで Q3 における欠損遺伝子の同定を行ったところ、*A. nidulans* の SR protein-specific kinase F（SrpkF）と 38% の相同性を有す遺伝子の ORF 中に T-DNA が挿入されていることが明らかとなった。*A. aculeatus* の SrpkF は 418 アミノ酸から成り、Q3 では T-DNA 挿入によるフレームシフトにより 328 番目以降の C 末端領域が欠失することが判明した。よって、Q3 のセルロース資化能の低下は SrpkF の機能欠損によるものである事が示唆された。

そこで SrpkF の機能を遺伝学的に解析するため、*srpkF* 破壊株（Δ*srpkF*）、および Q3 を模倣した *srpkF* の C 末端破壊株（ΔC*srpkF*）、Δ*srpkF* に遺伝子を相補した株（*srpkF*+）を作出した。これらの株について結晶性セルロースを単一炭素源として培養後、セルラーゼ遺伝子の発現量を qRT-PCR により定量した。その結果、Δ*srpkF* において endo-1,4-beta-xylanase 遺伝子（*xynIb*）の発現量がコントロールに比べ約 40% にまで有意に低下していた（$p$<0.05）。また、その他複数のセルラーゼ遺伝子の発現が減少または減少傾向（$p$<0.1）にあることが明らかとなった。一方で、*srpkF* 遺伝子の発現は、1% グルコース条件下での発現量に比べて炭素源飢餓条件下で約 100 倍、1% セルロース条件下で約 40 倍増大していた。さらに、最少培地および完全培地に 1 M NaCl を添加した条件で各 *srpkF* 変異株の生育を観察したところ、最少培地に 1 M NaCl を含む培養条件下でΔC*srpkF* を生育させた場合のみ分生子数が減少し、多分岐した菌糸が観察された。以上の結果から、貧栄養条件下で発現する SrpkF は、セルロース誘導および塩ストレス応答に関与する因子であるということが示唆された。

*Aspergillus*, cellulase, transcriptional regulation

講演番号：2C24p05
講演日時：3 月 18 日 15:00～ C 校舎 24 会場

メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* における Hap 複合体の機能解析
Functional analyses of Hap complex in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*
○小田 沙織[1]、由里本 博也[2]、阪井 康能[2] ([1]鳥取大工、[2]京大院農)
○Saori ODA[1], Hiroya YURIMOTO[2], Yasuyoshi SAKAI[2] ([1]Tottori Univ., [2]Kyoto Univ.)

メタノール資化性酵母は強力なメタノール誘導性遺伝子プロモーターを持つため、異種遺伝子発現系の宿主として広く利用されている。メタノール誘導性遺伝子発現を制御する分子機構については、関与する転写調節因子の探索や機能解析が進められているが、全貌の解明にはまだ至っていない。我々はこれまでに *Candida boidinii* および *Pichia pastoris* という二種類のメタノール資化性酵母を用いて、転写因子 Hap 複合体の機能解析を行ってきた。

Hap 複合体は Hap2、Hap3、Hap5 で構成されており、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においてグルコース枯渇時に呼吸代謝関連遺伝子の転写を活性化することが知られている。しかし *C. boidinii* の Hap 複合体は、コア領域において ScHap 因子と高い相同性を示すにも関わらず、メタノール誘導性遺伝子の転写を特異的に活性化することがわかった。CbHap 複合体構成因子のうち CbHap3 の C 末端側約 40 a.a.は、メタノール資化性酵母間でのみ高度に保存されていた。そこで CbHap3 のアミノ酸欠失実験を行ったところ、N 末端側のコア領域（16-100 a.a.）は Hap 複合体の形成や DNA 結合に関わる一方、C 末端側領域（225-292 a.a.）はターゲット遺伝子の転写活性化に寄与することがわかった（Oda et al., Microbiology 2016)。メタノール資化性酵母間で保存された領域が見つかり、これがメタノール誘導性遺伝子の転写活性化に寄与することから、メタノール誘導性遺伝子発現を制御する分子機構は他の酵母においても共通であると考えられた。そこで、工業的に繁用されているメタノール資化性酵母 *P. pastoris* において Hap 複合体構成因子をコードする遺伝子を探索したところ、HAP3 ホモログ遺伝子を 2 つ見出し、それぞれ *PpHAP3-1*、*PpHAP3-2* とした。それらの発現産物のアミノ酸配列を比較すると、PpHap3-1 の C 末端側にはメタノール資化性酵母間で保存された領域が存在するが、PpHap3-2 にはそのような領域が存在しなかった。それぞれの遺伝子破壊株（*Pphap3-1Δ*、*Pphap3-2Δ*）を取得して表現型を調べた結果、*Pphap3-1Δ* はメタノール培地でほとんど生育せず、メタノール誘導性遺伝子の転写レベルも顕著に低下していたのに対し、*Pphap3-2Δ* はメタノール培地での生育、メタノール誘導性遺伝子の転写レベル共に野生株と同程度であった。この結果から、*P. pastoris* においても Hap3 の C 末端側領域がメタノール誘導性遺伝子発現に重要であることが示唆された。一方、*Pphap2Δ* はメタノールだけでなくグルコースやグリセロールを炭素源とする培地でも生育の低下を示した。CbHap 複合体はメタノール以外の炭素源での生育には影響しないことから、同じメタノール資化性酵母であっても CbHap 複合体と PpHap 複合体の生理機能には異なる部分があると考えられる。

methanol induced gene expression, *Pichia pastoris*, transcription factor

発表責任者：小田　沙織（s.oda@bio.tottori-u.ac.jp）

講演番号：2C24p06
講演日時：3 月 18 日 15:25～ C 校舎 24 会場

超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* の転写制御因子 Lrp/AsnC に関する研究
Lrp/AsnC family proteins in hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakarensis*
○福田 青郎[1]、内田 圭亮[1]、ジャジリ アブドル アジズ[1]、市村 瑞葉[1]、何 あゆみ[1]、金井 保[2]、跡見 晴幸[2]、今中 忠行[1] ([1]立命館大生命、[2]京大院工)
○Wakao FUKUDA[1], Keisuke Uchida[1], Abdul Aziz Jaziri[1], Mizuha Ichimura[1], Ayumi Ga[1], Tamotsu Kanai[2], Haruyuki Atomi[2], Tadayuki Imanaka[1] ([1]Ritsumeikan Univ., [2]Kyoto Univ.)

【研究背景・目的】転写調節は生命の維持する上で非常に重要であり、現在までに様々な生物の転写制御に関する研究報告がなされてきた。しかしながら超好熱菌の持つ転写制御因子の中で働きが明らかになっているものはほんの一部であり、大多数の転写制御因子の役割は不明である。超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* においても、ゲノム解析より 82 個の転写制御因子の存在が予想されているが、他のアーキアと同様にその働きが明確な転写制御因子はほんのわずかである。そこで本研究では超好熱菌 *T. kodakarensis* を題材とし、遺伝子破壊により網羅的に各転写因子の細胞内における働きを解明することで、超好熱菌の転写調節について広範囲の知見を得ることを目的とした。
【結果】これまでに 64 種類の転写制御因子について遺伝子破壊を試みた。その結果、48 個の転写調節因子について遺伝子破壊に成功し、16 個については遺伝子破壊株が得られなかった。これまでに得られた遺伝子破壊株に関してマイクロアレイ解析を行い、遺伝子破壊が転写制御に与える影響の解析を行った。その結果、野生株に比べ大きな転写産物量変動が見られた遺伝子があり、これら遺伝子は破壊した各転写制御因子の制御下にあると予想された。今回はこの解析結果のうち、Lrp/AsnC (leucine-responsive regulatory protein/asparagine synthase C products) family についての結果を紹介する。

Lrp/AsnC family の転写制御因子はバクテリアやアーキアに広く分布し、栄養状態に関わると考えられている。*T. kodakarensis* では Lrp/AsnC ホモログを 14 個 (TK0168、TK0508、TK0567、TK0834、TK1210、TK1259、TK1285、TK1331、TK1487、TK1491、TK1955、TK2052、TK2110、TK2134) 有している。これら 14 個について DNA やリガンド結合ドメインのアミノ酸配列を基に系統樹を作製したところ、TK1331 と TK1955 のリガンド結合ドメインは、系統樹上で同じ枝に位置した。しかしそれ以外は特定の枝に位置することはなく、明確な関連は見られなかった。またそれぞれのマイクロアレイ解析の結果をみると、物質輸送やアミノ酸を含む有機酸代謝に関わる遺伝子の転写量が特に大きく動いているものが多く、一般に言われているように *T. kodakarensis* においても Lrp/AsnC 群は細胞の栄養状態に関連する転写制御を行うと予想された。一方で TK1210、TK2052、TK2134 遺伝子破壊株（ΔTK1210 株、ΔTK2052 株、ΔTK2134 株）では多くの hypothetical protein の転写産物量が増減していた。興味深いことに増減している遺伝子の多くがこの 3 株で共通しており、ΔTK1210 株と ΔTK2052 株で正の相関がみられ、ΔTK2134 株とは負の相関がみられた。

Hyperthermophile, Transcriptional regulator, Archaea

発表責任者：福田青郎（wfukuda@sk.ritsumei.ac.jp）

講演番号：2C24p07
講演日時：3 月 18 日 15:40～ C 校舎 24 会場

大腸菌 CsrD による小分子 RNA CsrB の分解制御
Regulation of CsrB small RNA decay by CsrD in *Escherichia coli*
天木 拓海[1]、坂井 航[1]、杉本 華幸[1,2]、渡邉 剛志[1,2]、○鈴木 一史[1,2] ([1]新潟大院・自然科学、[2]新潟大・農・応生化)
Takumi AMAKI[1], Wataru SAKAI[1], Hayuki SUGIMOTO[1,2], Takeshi WATANABE[1,2], ○Kazushi SUZUKI[1,2] ([1]Grad. Sch. Sci. & Tech., Niigata Univ., [2]Dept. Appl. Biol. Chem., Facul. Agric., Niigata Univ.)

細菌のバイオフィルム形成、運動性、解糖系、病原性等、様々な遺伝子の発現調節に関わる Csr (carbon storage regulator)システムは、多くの真正細菌に存在する。その中でも大腸菌の Csr システムの解析が進み、その仕組みが明らかになってきた。大腸菌 Csr システムは２つのタンパク質と２つの small RNA から構成されている。RNA 結合タンパク質 CsrA は、*glgCAP*, *pgaABCD* や *flhDC* など、ターゲットとなる mRNA の 5′UTR に結合し、翻訳や mRNA 安定性を変化させることで転写後の遺伝子発現を調節しており、Csr システムの活性の中心となっている。２つの small RNA・CsrB 及び CsrC は複数の CsrA 結合部位を含むステムループ構造からなり、CsrA を捕捉することで、CsrA の mRNA への結合を阻害し、その働きを調節する。もう一方のタンパク質 CsrD は GGDEF-EAL ドメイン・タンパク質であるが、一般的な GGDEF-EAL ドメイン・タンパク質とは異なり c-di-GMP の合成・分解には関与せず、CsrB/C RNA の RNase E (Degradosome) 依存的な分解を調節することで CsrA の細胞内での働きを制御している。また、CsrD は PTS タンパク質 $EIIA^{Glc}$ の結合を介して活性化されることが明らかとなった。CsrB/C RNA とその安定性を調節する CsrD は、細胞内での CsrA の働きを微妙にコントロールできる重要な因子であると考えられる。CsrB RNA の分解には、CsrD 及び RNase E が必須である。このメカニズムを解明するため、CsrB RNA の分解過程を解析したところ、CsrB RNA の 3′末端のターミネーター上流に位置する一本鎖部分内の切断がその後の CsrB RNA の完全分解に必要であり、この切断部位の近傍に CsrA が結合することで RNase E による切断が阻害されることが明らかとなった。[1)]

CsrD は、CsrA が関与する CsrB RNA の安定化を阻害する作用を示し、それは $EIIA^{Glc}$ の結合によって活性化される。そこで、コハク酸もしくはグルコースを添加した最小培地で大腸菌を培養し、対数増殖期後期でリファンピシンを添加した後、一定時間ごとにサンプリングして CsrB RNA の半減期を求めた。その結果、グルコース添加培地では CsrB RNA が速やかに分解されるのに対し、コハク酸添加培地の CsrB RNA の半減期は長かった。さらに、コハク酸添加培地で培養後、グルコースを培地に添加して CsrB RNA の半減期を測定したところ、グルコース添加後速やかに CsrB RNA の分解が生じることがわかった。CsrD の活性は $EIIA^{Glc}$ を介して速やかに調節され、これによって CsrA 支配下の遺伝子群の発現が制御されると考えられた。

1) C. A. Vakulskas, Y. Leng, H. Abe, T. Amaki, A. Okayama, P. Babitzke, K. Suzuki, and T. Romeo. (2016) Antagonistic control of the turnover pathway for the global regulatory sRNA CsrB by the CsrA and CsrD proteins. Nucl. Acids Res. 44 (16): 7896-7910.

small RNA, Csr system, RNase E

発表責任者：鈴木一史（ksuzuki@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：2C24p08
講演日時：3 月 18 日 15:55～ C 校舎 24 会場

# 枯草菌 PBSX ファージの誘導機構の解析

# Analysis of PBSX phage induction in *Bacillus subtilis*

○山本 達也、野村 暢彦（筑波大生命環境）
○Tatsuya YAMAMOTO, Nobuhiko NOMURA (Univ. of Tsukuba)

溶原性ファージは細菌のゲノムに入り込み、その細菌と共に増殖する。一方、宿主細菌が DNA ストレスなどにさらされると、誘導され、増殖、細胞を溶菌し細胞外に放出される。そのため、溶原性ファージは通常状態では誘導を抑制する一方、ストレス時には速やかにその抑制が解除される仕組みが必要である。枯草菌野生株 168 株は 10 個のプロファージ領域を持つ。この内、PBSX ファージは細胞外のプロテオーム解析から、そのファージ粒子が非ストレス条件下においても細胞外に放出されていることが明らかとなっている。PBSX が誘導されると溶菌、細胞死を引き起こすため、この非ストレス時の放出は、非ストレス時においても一部の細胞でのみ PBSX の誘導が起きていることを示唆する。そこで、本研究ではこの PBSX の誘導機構について解析することとした。

PBSX ファージが誘導されている細胞を検出するために PBSX の後期遺伝子オペロンのプロモーター、P*L* の ZsGreen レポータープラスミドを作成し、枯草菌に導入し、フローサイトメーターにより、PBSX 誘導細胞の割合を測定した。LB 培地による培養では 1~2%程度の細胞で蛍光が観察され、実際に通常の培養条件においても一部の細胞で PBSX ファージの誘導が起きていることが示唆された。一方、MMC 添加時には 80%程度細胞で蛍光が観察されたが、残りの 20%程度の細胞では蛍光は観察されず、二峰性の遺伝子発現を示した。PBSX ファージの誘導には RecA が関与していることが知られているため、SOS 応答遺伝子 *tagC* の遺伝子発現を同様に蛍光レポーターを用いて解析した。MMC 非添加時には P*L* 同様に数%の細胞でのみ、発現していたが、MMC 添加時には 99%以上の細胞で発現していた。このことから、SOS 応答は全ての細胞で起きているにも関わらず、一部の細胞では PBSX 誘導が起きていないことが明らかとなった。また、RecA 欠損株において、P*L* 及び P*tagC* の発現を解析すると MMC の添加、非添加に関わらず、誘導は見られなくなった。そのため、MMC 非添加時の通常の培養条件においても一部の細胞で DNA ストレスが生じ、PBSX の誘導が起きていることが考えられた。また、MMC の濃度を変化させ、P*L* 及び P*tagC* の発現を解析すると、P*L* では蛍光強度は変化せず、蛍光を発する細胞の割合が変化する一方、P*tagC* では発現強度の変化が見られた。以上の結果から、SOS 応答はストレスの強度に応じて遺伝子発現量を調節する一方、PBSX ファージの誘導はストレス強度に応じて誘導される細胞の割合を変化させていることが明らかとなった。

*Bacillus subtilis*, bacteriophage, phage induction

講演番号：2C24p09
講演日時：3 月 18 日 16:10～ C 校舎 24 会場

# 多芸多才な微生物 Alcaligenes denitrificans A41 株のポリヒドロキシアルカン酸(PHA)合成関連遺伝子群の制御

# Regulation of a cluster of the PHA production related genes in a versatile bacterium, Alcaligenes denitrificans A41

○木原 天衣、前田 理久（明治大学農学研究科農芸化学専攻）
○Takae KIHARA, Michihisa MAEDA (Meiji Univ.)

*Alcaligenes denitrificans* A41 株(以下 A41 株)は、生分解性プラスチックであるポリヒドロキシアルカン酸(以下、PHA)合成能だけでなく PCB 分解能、脱窒能をもち、さらにアルカリ耐性や有機溶媒耐性ももつ多芸多才なバクテリアである。A41 株は窒素制限下で炭素源コハク酸あるいはビフェニルから PHA を合成し、菌体内に蓄積する。本研究では、A41 株のゲノム上で PHA 生産の中心的役割を担っていることが予想される遺伝子座(*phaC1, phaB1, phaR* の順で並び、それぞれ PHA シンターゼ、アセトアセチルレダクターゼ、 制御因子をコードすることが推測されている)の発現制御について解析した。

*phaC1* 上流領域のプロモーター領域を解析するため、開始コドン上流領域 574 bp を PCR で増幅し、レポータープラスミドに挿入した。一方で、バイオインフォマティクスより、*phaC1* 上流領域に転写因子結合領域と予想される領域が見られたことから、その上流部分を欠失させた 313 bp をレポータープラスミドに挿入してプロモーター活性を解析した。コハク酸単一炭素源の場合、313 bp 領域では著しく活性が低下した。このことは、欠損させた領域に何らかの転写因子が相互作用し、活性化している可能性を示唆している。一方、ビフェニル単一炭素源の場合、両領域ともに活性が低く、パターンもあまり変化しなかった。この結果は、コハク酸単一炭素の場合とは異なる制御がはたらいている可能性を示唆するが、PHA 生産量との関係が明確でないため、引き続き解析を行っている。通常 PHA 生産は、PHA 生産は菌体を十分に確保した後に窒素源を制限して行っている。この工程における *phaC1* 遺伝子発現パターンは、コハク酸単一炭素源の場合、培養期間中ほぼ一定量の活性を示した。

*phaC1, phaB1, phaR* がゲノム上にクラスターとして存在することからこれらがオペロンを形成していることが予測された。このオペロンの転写制御因子としてはたらいている可能性のある PhaR の機能を明らかにするために、まず、*phaR* 破壊株における *phaC1* のプロモーター活性をコハク酸単一炭素源条件下で測定した。その結果、窒素を制限していない菌体増殖条件下では、野生株と比較して発現パターンが変化した。一方、PHA 生産培養時では、2～3 倍ほど活性化されていた。このことは、培養条件によって異なる制御を受けていることを示唆するが、効果が小さいため、PHA 蓄積率を比較した。その結果、*phaR* 欠損株での蓄積速度は明確に遅くなっていた。現在、*phaR* 欠損株の性質の再現性を確認するとともに、さらなる解析を行っている。

polyhydroxyalkanoate, gene regulation, phaR

発表責任者：木原天衣（takae.mint@gmail.com）

講演番号：2C24p10
講演日時：3 月 18 日 16:25～ C 校舎 24 会場

# 植物由来 *Pseudomonas chlororaphis* の抗菌物質フェナジン生産における Quorum Sensing 多重制御機構の解析

# Characterization of multiple quorum-sensing systems which regulate phenazine antibiotic production in plant-associated *Pseudomonas chlororaphis*

○諸星 知広[1]、山口 貴人[1]、謝 肖男[2]、竹内 香純[3]、染谷 信孝[3]（[1]宇大院工、[2]宇大バイオ、[3]農研機構）
○Tomohiro MOROHOSHI[1], Takahito YAMAGUCHI[1], Xiaonan XIE[2], Kasumi TAKEUCHI[3], Nobutaka SOMEYA[3] ([1]Grad. Sch. Eng., Utsunomiya Univ., [2]Bio. Sci. Cent., Utsunomiya Univ., [3]NARO)

【目的】ジャガイモ根から単離した *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* StFRB508 株は、様々な植物病原性真菌類の増殖を阻害する抗菌物質フェナジンを生産する。ある種の細菌では、抗菌物質生産がアシル化ホモセリンラクトン（AHL）を介した細胞密度依存的情報伝達機構 Quorum Sensing により制御される例が報告されている。StFRB508 株には、染色体上に 3 種類の AHL 合成遺伝子および AHL レセプター遺伝子のセット（*phzI*/*phzR*、*aurI*/*aurR*、*csaI*/*csaR*）が存在することをこれまでに明らかにしている。本研究では、この 3 組の Quorum Sensing 制御系がどのようにフェナジン生産を制御するか、そのメカニズムを解明することを目的とした。
【実験方法及び結果】ノンマーカー遺伝子破壊法により、StFRB508 株染色体上の AHL 合成遺伝子 *phzI*、*aurI*、*csaI* を全ての組み合わせで破壊した多重破壊株を作成した。その結果、*phzI* を破壊するとフェナジン生産が大幅に減少し、すべての遺伝子を破壊するとフェナジン生産が完全に消失することが明らかとなった。次に、PhzI、AurI、CsaI が生産する AHL の構造を LC-MS/MS で解析したところ、AurI と CsaI は C6-HSL と 3-oxo-C6-HSL を、PhzI は主に 3-hydroxy-C6-HSL を生産することが明らかになった。また、AHL 合成遺伝子の 3 重破壊株に外部から AHL を添加してフェナジン生産の応答を調べたところ、C6-HSL と 3-oxo-C6-HSL はわずかにフェナジン生産を誘導するが、3-hydroxy-C6-HSL はより低濃度でフェナジン生産を誘導することが明らかになった。さらに、AHL レセプター遺伝子 *phzR*、*aurR*、*csaR* を全ての組み合わせで破壊したところ、*phzR* の破壊のみでフェナジン生産が消失したことから、PhzR がフェナジン生産の調節因子であることが明らかとなった。以上より、StFRB508 株では、PhzI、AurI、CsaI により生産される AHL にレセプターである PhzR が応答し、フェナジン生合成遺伝子の発現を活性化する Quorum Sensing の多重制御機構が存在することが明らかとなった。

Pseudomonas chlororaphis, phenazine, quorum sensing

講演番号：2C24p11
講演日時：3 月 18 日 16:50～ C 校舎 24 会場

# 改変型リボソーム構築による異種間における翻訳開始機構の多様性の解析

# Analysis of diversity on translation initiation between different species by constructing modified ribosome in *Bacillus subtilis*

○渡辺 正樹[1]、渡辺 葵[1]、渡辺 智[1]、赤沼 元気[2]、河村 富士夫[1,2]、吉川 博文[1] ([1]東京農大・院・バイオ、[2]立教大・生命理学)
○Masaki WATANABE[1], Aoi WATANABE[1], Satoru WATANABE[1], Genki AKANUMA[2], Fujio KAWAMURA[1,2], Hirofumi YOSHIKAWA[1] ([1]Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Rikkyo Univ.)

【背景】

バクテリアの遺伝子の翻訳開始には mRNA の開始コドンの 5'側上流に存在する SD 配列と 16S rRNA の 3'末端との水素結合の形成が重要であることが知られている。グラム陽性細菌である枯草菌は、翻訳効率の高いほとんどの遺伝子が 16S rRNA-3'末端（CCTCC）に相補する SD 配列(GGAGG)を有しており、SD 配列に依存して翻訳レベルが厳密に制御される。一方、大腸菌やシアノバクテリアといったグラム陰性細菌では 16S rRNA-3'末端に相補する SD 配列を持つ遺伝子の割合が枯草菌に比べて低いことも知られており、翻訳開始機構には種間における多様性が存在すると考えられる。

【目的・結果】

我々は翻訳開始機構の多様性を明らかにすることを目的として、枯草菌とシアノバクテリア間の翻訳システムを比較した。シアノ細胞内で高発現している RubisCO をコードする *rbcS* の 5'-UTR を大腸菌の *lacZ*（β-ガラクトシダーゼ）に連結したレポーター系を枯草菌に導入した。枯草菌細胞内では *rbcS*-5'-UTR-*lacZ* の翻訳活性はほとんど検出されなかった。これは枯草菌リボソームがシアノの SD 配列を認識できなかったことに起因すると考え、枯草菌リボソームの改変を試みることにした。

大腸菌やシアノの翻訳開始には 16S rRNA の 3'側近傍に結合するリボソームタンパク質 S1 が寄与することが知られている。一方、枯草菌において S1 は翻訳機能に必須ではなく、70S リボソームに結合しない。このことから、我々は 16SrRNA の 3'側近傍に結合するリボソームタンパク質(S14、S10、S3、S2、S1)がシアノ遺伝子の翻訳開始において重要であると考え、枯草菌のリボソームタンパク質との置換を試みている。これまで、枯草菌の S14 をシアノの S14 に完全置換することに成功し、リボソームタンパク質の相補性を証明した。しかし、S14 の置換だけでは *rbcS* 5'-UTR の翻訳活性は認められなかった。現在、さらなるリボソームの改変により、枯草菌細胞内でのシアノ遺伝子の翻訳活性が向上するか否かを試みている。

translation initiation, diversity, ribosome assembly

講演番号：2C24p12
講演日時：3 月 18 日 17:05～ C 校舎 24 会場

# pCAR1 上のカルバゾール分解遺伝子群の発現は一細胞レベルでどのように異なっているか？

# Heterogeneous gene expression of carbazole-degradative genes on pCAR1 in different *Pseudomonas* strains

○高比良 早紀、山本 夏実、水口 千穂、岡田 憲典、野尻 秀昭（東大・生物工学セ）
○Saki Takahira, Natsumi Yamamoto, Chiho Suzuki-Minakuchi, Kazunori Okada, Hideaki Nojiri (The Univ. of Tokyo)

**【背景・目的】**プラスミドは難分解性物質分解能等の新規形質を宿主に付与するが、新しく獲得された遺伝子の機能の仕方は宿主によって異なる。当研究室では、カルバゾール分解プラスミド pCAR1 を 6 種の *Pseudomonas* 属細菌に保持させた際のトランスクリプトームを比較し、pCAR1 上の遺伝子の転写が宿主によって異なることを明らかにした（Shintani *et al.,* 2011, *Plasmid*. 66: 85-92)。これは、プラスミド上の遺伝子の転写制御に宿主細胞由来の因子も影響を及ぼすためだと考えられる。更に、クローン細胞集団において同一遺伝子の発現が一細胞レベルで異なる例が報告されており、プラスミド上の遺伝子の発現も一細胞レベルで異なると予想される。すなわち、接合伝達性の分解プラスミドが環境中の微生物集団中で宿主を変えながら“分解菌集団”を形成する際には、宿主による分解力の揺らぎに加え、一細胞レベルでの分解力の揺らぎも集団全体の分解力を特徴づけるのではないかと考えられる。そこで、本研究では異なる *Pseudomonas* 属細菌での pCAR1 上のカルバゾール分解遺伝子群の発現を一細胞レベルで解析し、宿主間の差異を明らかにすることを目的とした。

**【方法・結果】**アントラニル酸存在下でカルバゾール分解遺伝子群の転写を誘導する $P_{ant}$ プロモーター、及び恒常的にカルバゾール分解遺伝子群の転写を誘導する $P_{carAa}$ プロモーターの下流に *gfp* が結合した遺伝子カセットを作製し、ミニトランスポゾン mini-Tn*7*T を用いて *Pseudomonas putida* KT2440(pCAR1)株及び *Pseudomonas fluorescence* Pf0-1(pCAR1)株の染色体上に挿入することで解析用の菌株を作製した。$P_{carAa}$ についてはコハク酸培地で培養時の緑色蛍光強度をフローサイトメーターで経時的に測定したが、蛍光は検出されなかった。$P_{carAa}$ からの遺伝子発現は恒常的ではあるが弱いため、今回用いた系での解析は困難であることが示唆された。一方、$P_{ant}$ については、0.01, 0.1, 1 mg/ml のアントラニル酸を添加したコハク酸培地で培養時の緑色蛍光強度を経時的に測定した。その結果、両株共に培地中のアントラニル酸濃度に応じて誘導のかかり方に差があり、更に、誘導がかかる過程で集団中の一部の細胞が示す蛍光が低く、クローン集団中に $P_{ant}$ の誘導がかかりやすい細胞とかかりにくい細胞が存在する可能性が示唆された（図)。今後、宿主を増やすと共に、$P_{ant}$ からの発現が弱い細胞を分取し、その原因を探ることを予定している。

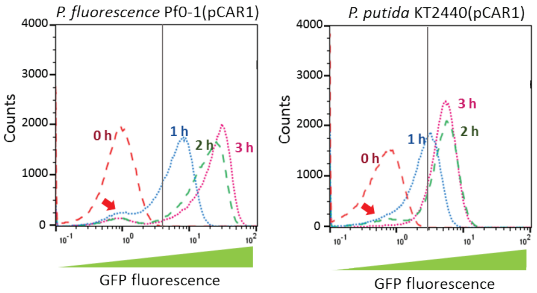



**図1. *P. fluorescence* Pf0-1(pCAR1)及び*P. putida* KT2440(pCAR1)における $P_{ant}$の発現の変化**
0.01 mg/mlのアントラニル酸を添加した培地での$P_{ant}$の発現を示す。灰色の線はnegative controlの示す緑色蛍光強度の最大値を示す。赤い矢印で指した集団は$P_{ant}$からの遺伝子発現が弱い集団であると考えられる。

*Pseudomonas*, single-cell, heterogeneity

発表責任者：野尻秀昭（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2C24p13
講演日時：3 月 18 日 17:20～ C 校舎 24 会場

プラスミド・宿主染色体由来 H-NS ファミリータンパク質のヘテロ多量体形成機構
Hetero-oligomerization manners of plasmid- and chromosomally encoded H-NS family proteins
○水口 千穂[1]、ヴァシレヴァ デリアナ[1]、藤本 瑞[2]、寺田 透[3]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1,3] ([1]東大・生物工学セ、[2]農研機構、[3]東大院農生科・アグリバイオ)
○ Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1], Delyana VASILEVA[1], Zui FUJIMOTO[2], Tohru TERADA[3], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1,3] ([1]BRC, The Univ. of Tokyo, [2]NARO, [3]Agric. Bioinformatics Res. Unit, Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】細菌の核様体タンパク質の一種である H-NS ファミリータンパク質群は、C 末端ドメインで DNA に結合し、N 末端ドメインで DNA 上にホモ・ヘテロ多量体を形成することで遺伝子の転写制御を行う。当該タンパク質群は染色体のみならずプラスミドにもコードされており、このようなプラスミドを細菌が保持すると、染色体由来の因子による既存の転写制御ネットワークにプラスミド由来の因子が取り込まれる。当研究室ではこの過程について、プラスミド pCAR1 由来の Pmr と宿主 *Pseudomonas putida* KT2440 株染色体由来の TurA・TurB をモデルとして研究を進めてきた。過去の研究から、Pmr, TurA, TurB は DNA 上で数 kb にわたりヘテロ多量体を形成していること、ヘテロ多量体の形成範囲（Pmr, TurA, TurB が転写制御を行う範囲）は各分子が持つ DNA との親和性とタンパク質間の親和性で決まることが示唆されていた。本研究ではこのうちタンパク質間の親和性に着目し、N 末端ドメインの結晶構造から Pmr, TurA, TurB 間の結合親和性を決める要因について考察した。
【結果・考察】昨年度本大会では、TurB の二量体／多量体化ドメインの結晶構造（分解能 2.3 Å）を明らかにし、TurB は 2 つの二量体化部位（central dimerization site および terminal dimerization site）を用いてホモ多量体を形成することを報告した [Suzuki-Minakuchi *et al*., 2016, *FEBS Lett.*, 590:3583-94]。TurB の central dimerization site では疎水コアの存在が確認されたが、これを形成する 10 残基の全てが Pmr では保存されており、TurA でも 1 残基（I54 が V に置換）を除き全残基が保存されていた。また同部位では 6 組の水素結合も確認されたが、このうち側鎖－主鎖間の水素結合 2 組を除く 4 組を形成する残基は Pmr, TurA でも保存されていた。この 4 組のうち 3 組は TurB の結晶構造を基に作製した Pmr, TurA のモデル構造でも確認されたが、TurB が A 鎖の Y47 と B 鎖の E35 の間で水素結合を形成していたのに対し、Pmr, TurA のモデル構造では A 鎖の Y47 と B 鎖の K39 が水素結合を形成していた。一方 terminal dimerization site については、coiled-coil 構造を用いて二量体を形成すると予測されているものの、結晶構造は当該領域内に存在する R8 にアラニン置換を導入して取得したため本来の構造が得られていない。しかし、Pmr で当該領域の二量体形成に関わると示唆された 6 残基のうち全てが TurA で保存されていたのに対し、TurB では 3 残基しか保存されていなかった。過去の実験から Pmr-Pmr, TurA-Pmr 間と、TurB-Pmr 間では結合比が異なることが示唆されている [Suzuki *et al*., 2014, *PLOS ONE*, 9:e105656]。Central dimerization site の二量体形成様式が Pmr, TurA, TurB 間で似ていたことを考慮すれば、この違いは terminal dimerization site の親和性の違いに起因する可能性が示唆された。

nucleoid-associated proteins, H-NS family proteins, *Pseudomonas*

発表責任者：野尻 秀昭（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2C24p14
講演日時：3 月 18 日 17:35～ C 校舎 24 会場

Quantification of H-NS family proteins in *Pseudomonas putida*

○Zongping SUN[1,2], Delyana VASILEVA[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1], Kazunori OKADA[1], Feng LUO[2], Yasuo IGARASHI[2], Hideaki NOJIRI[1,2] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Southwest Univ.)

**[Background]** H-NS family proteins are functional homologues of enterobacterial H-NS, constituting one group of nucleoid-associated proteins. These proteins functions cooperatively as global transcriptional regulator in the cells, because they have DNA-binding and heterooligomerizing abilities. In our former study, we investigated the function of H-NS family proteins encoded on the carbazole-degradative plasmid pCAR1 (Pmr) and the chromosome of *Pseudomonas putida* KT2440 (TurA and TurB). Considering that some plasmids contain the genes encoding H-NS family proteins, transcriptional network in host cells may be remodeled after conjugation. To clarify this process, together with the physiological investigation of H-NS family proteins, it is quite important to quantify their concentrations in the cells. In this study, we analyzed how much TurA and TurB were transcribed and translated in KT2440 (KT) and pCAR1-carrying KT (KTPC) cells. **[Methods and Results]** Specific anti-TurA and anti-TurB antibodies were produced by using synthetic peptides, which correspond to residues 61-77 for TurA and 12-29 for TurB, respectively. After confirmation of the antibody specificities, quantitative Western blotting followed by the calculation of band intensity by ImageJ software (http://rsbweb.nih.gov/ij/) were performed for KT and KTPC, which were separately cultured in L-broth for 2, 4, 6, 8, 10, 24 hours. The data indicated that the amount of TurA and TurB did not show significant difference in pCAR1-free and pCAR1-harboring KT2440. The number of TurA decreased from about 60,000 molecules/cell to about 20,000 molecules/cell during the growth phase. On the other hand, TurB was expressed only at stationary phase and increased from around 1,000 molecules/cell at early-stationary phase to around 6,000 molecules/cell in late-stationary phase. Transcriptional levels of *turA* and *turB* genes were also quantified by qRT-PCR. *turA* was transcribed mainly at the log phase while *turB* was transcribed mainly at stationary phase of KT and KTPC. These results were consistent with that of translation amount.

*Pseudomonas*, H-NS family proteins, nucleoid-associated proteins

発表責任者：野尻秀昭（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2C24p15
講演日時：3 月 18 日 17:50～ C 校舎 24 会場

# プラスミド・宿主染色体由来 H-NS ファミリータンパク質の DNA との結合親和性の定量
# DNA-binding affinities of plasmid- and chromosomally encoded H-NS family proteins

○角埜 裕基[1]、水口 千穂[1]、高橋 裕里香[2]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1] ([1]東大・生物工学セ、[2]富山県大生工科・生工セ)
○Yuki KADONO[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1], Yurika TAKAHASHI[2], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Toyama Pref. Univ)

【背景・目的】細菌の核様体タンパク質の一種である H-NS ファミリータンパク質は、C 末端ドメインで DNA に結合し、N 末端ドメインで DNA 上にホモ・ヘテロ多量体を形成してグローバルな転写制御因子として機能する。この因子は染色体に限らずプラスミドにもコードされ、両方の遺伝子を協調的に制御している。我々の研究グループでは、この協調的制御の実体解明を目的に、プラスミド pCAR1 由来 Pmr と宿主 *Pseudomonas putida* KT2440 株染色体由来の TurA・TurB について解析してきた。以前の研究では、クロマチン免疫沈降法による解析から、ゲノム内の結合箇所の分布は三者で類似しているものの、結合領域の塩基配列と *p*-value (結合の確からしさ) との相関から、結合親和性の高い配列は三者で異なる可能性が示唆されていた。本研究では、三者の塩基配列特異性を生化学的に評価した。
【方法・結果】三者の DNA 結合ドメイン Pmr_ct, TurA_ct, TurB_ct をアナライト、三種類の二本鎖 DNA (12 塩基対から成る) をリガンドとして、表面プラズモン共鳴法により解離定数 ($K_d$) を算出した (Table 1)。Pmr_ct, TurA_ct, TurB_ct のいずれについても【A と T が交互に繰り返す配列】＞【G と C が交互に繰り返す配列】＞【A または T のみが連続する配列】の順に高い親和性を示すこと、どの二本鎖 DNA に対しても TurB_ct＞TurA_ct＞Pmr_ct の順に強い結合力を持つことが明らかとなった。しかし三者間で配列特異性の違いは見られなかった。細胞内では TurA が対数増殖期～定常期にかけて約 $6\times10^4$ 分子存在し、TurB は定常期特異的に約 $8\times10^3$ 分子発現する [Sun ら, 本大会で発表予定]。すなわち TurB は他の因子に比べて遅れて発現し、また発現量が少ないため、他の因子が形成したヘテロ多量体に割り込むために強い結合力をもつのではないかと考えられる。また、*Pseudomonas aeruginosa* の H-NS ファミリータンパク質 MvaT において DNA との結合に重要な残基が同定されており [Ding *et al*., 2015, PLoS Pathog, 11:e1004967]、TurA ではそれらの残基が完全に保存されている一方、Pmr では K81A、TurB では K81V、K102R の置換が起きている。MvaT が K81A 置換によって結合力が弱くなる報告は、TurA に比べて Pmr の結合力が弱くなっている本結果と一致する。DNA との結合に重要な残基の違いが三者の結合力の違いを生むと考えられる。

Table 1 表面プラズモン共鳴法によって得られた解離定数 (μM)

| リガンド / アナライト | GGG**ATATAT**CCC<br>CCC**TATATA**GGG | GGG**AAAAAA**CCC<br>CCC**TTTTTT**GGG | GGG**GCGCGC**CCC<br>CCC**CGCGCG**GGG |
|---|---|---|---|
| Pmr_ct | 12±2.0 | 920±110 | 240±34 |
| TurA_ct | 4.8±0.35 | 860±170 | 180±16 |
| TurB_ct | 3.0±0.054 | 330±22 | 86±4.2 |

Average (n=3) ± SD

nucleoid-associated proteins, H-NS family proteins, *Pseudomonas*

発表責任者：野尻秀昭（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2C24p16
講演日時：3 月 18 日 18:05～ C 校舎 24 会場

青枯病菌における TBDR の機能解析
Functional analysis of TonB-dependent receptors in Ralstonia solanacearum
○大西 浩平[1]、渡邉 諒介[2]、木場 章範[2]、曳地 康史[2] ([1]高知大総研セ、[2]高知大農)
○Kouhei OHNISHI[1], Ryosuke WATANABE[2], Akinori KIBA[2], Yasufumi HIKICHI[2] ([1]Kochi Univ. RIMG, [2]Kochi Univ.)

多くのグラム陰性細菌の細胞外膜には、鉄、ニッケル、ビタミン $B_{12}$、糖質の取り込みに関与する TonB-dependent receptor(TBDR)が存在し、内膜に局在する TonB と相互作用することで、ペリプラズムへの物質透過を促進する。一部の TBDR は、環境シグナルを感知し、環境へ適応するために遺伝子発現を変化させる TonB-dependent transducer(TBDT)として働くことが知られている。グラム陰性植物病原細菌の青枯病菌 OE1-1 株は、ゲノム解析により 15 種類の TBDR をもつことが判明している。しかしながら、３型分泌系の構築に関与していることが明らかになっている PrhA 以外の TBDR の機能については、未解明のままである。そこで、OE1-1 株の持つ TBDR の病原性への関与と機能解析を行うことを目的とした。
青枯病菌野生株 OE1-1 から 15 種類の TBDR 遺伝子を単独もしくは複数欠損させた遺伝子変異株を作成した。同時に *tonB* を特異的に欠損させた変異株も作成した。病原力の検定には、野生株と変異株を宿主植物ナスの根から接種することで行い、植物体内での増殖は菌株をナスの葉肉に注入し測定した。炭素源や鉄分の有無など組成の異なる培地を用いた試験管内での増殖能を調べることで受容シグナルの検定を行った。
*prhA* 変異株の病原力は野生株の半分程度に低下するという、これまでの報告例とよく一致する結果を得た。一方、それ以外の TBDR 一遺伝子変異株の中で、有意に病原力が低下した株は存在しなかった。野生株は鉄およびビタミン $B_{12}$ を含まない最少培地において生育可能である。*tonB* 変異株はこの最少培地において全く増殖できないが、15 種類の TBDR 遺伝子全てを欠損させた変異株も *tonB* 変異株とほぼ同様の表現型を示した。いずれも鉄とビタミン $B_{12}$ の両方を添加することで増殖能を回復した。*rsp0416* 変異株は、鉄を含まない最少培地において野生株よりも顕著に増殖能が低下したことから、鉄の取り込みに主に関与する TBDR は Rsp0416 であることが強く示唆された。しかし、変異株の病原力が低下しなかったことから、植物細胞間隙内では鉄が十分量存在していることが推察された。*rsc2920* 変異株はバイオフィルム形成能が上昇していることが明らかとなり、青枯病菌において Rsc2920 はバイオフィルムの形成を抑制していることが推察された。Rsc2920 はアンチシグマ、ECF シグマ因子を制御する TBDT であることから、現在、Rsc2920 の制御下にある遺伝子についての探索を行っている。

Ralstonia solanacearum, TonB, TBDR

発表責任者：大西浩平（kouheio@kochi-u.ac.jp）

講演番号：2C25a01
講演日時：3 月 18 日 09:20～ C 校舎 25 会場

*Lactobacillus kunkeei* FF30-6 が生産する抗ヨーロッパ腐蛆病菌活性を有する新奇バクテリオシンの同定

Identification of a novel anti-*Melissococcus plutonius* bacteriocin produced by *Lactobacillus kunkeei* FF30-6

○大橋 千紘[1]、前野 慎太郎[2]、朴 興国[1]、善藤 威史[1]、SALMINEN Seppo[3]、遠藤 明仁[2]、園元 謙二[1,4]([1]九大院・農、[2]東農大院・生物産業、[3]トゥルク大・食品機能フォーラム、[4]九大・バイオアーク)

○Chihiro OHASHI[1], Shintaro MAENO[2], Xingguo PIAO[1], Takeshi ZENDO[1], Seppo SALMINEN[3], Akihito ENDO[2], Kenji SONOMOTO[1,4] ([1]Fac. Agric, Kyushu Univ., [2]Fac. Bioindustry, Tokyo Univ. of agriculture, [3]Functional Foods Forum, Univ. of Turku, [4]Bio-Arch, Kyushu Univ.)

【背景・目的】*Melissococcus plutonius* は、ミツバチの家畜伝染病であるヨーロッパ腐蛆病の原因となるグラム陽性菌で、ミツバチ減少の一因となっている。一方、乳酸菌が生産する抗菌ペプチドであるバクテリオシンは広くグラム陽性菌に抗菌活性を示す。本研究は、*M. plutonius* に対するバクテリオシン様の抗菌活性が見出されたミツバチ消化管由来のフルクトフィリック乳酸菌 *Lactobacillus kunkeei* FF30-6 が生産するバクテリオシンの構造決定を目的とした。

【方法】*Lb. kunkeei* FF30-6 の培養液上清および各精製段階での種々の検定菌に対する抗菌活性の評価は、Spot-on-lawn 法で行った。培養液上清中のバクテリオシンを疎水性相互作用による合成吸着剤への吸着、陽イオン交換クロマトグラフィー、逆相 HPLC の 3 段階で精製した。抗菌活性を示した逆相 HPLC での精製画分について、ESI-TOF MS による分子量測定、およびエドマン分解による N-末端アミノ酸配列解析を行った。また、精製画分をアルカリ還元処理したものについても N-末端アミノ酸配列解析を試みた。さらに、*Lb. kunkeei* FF30-6 の全ゲノム解析結果から、バクテリオシン様配列の探索を行った。以上により得られた配列情報を総合し、バクテリオシンの構造を推定した。

【結果】*Lb. kunkeei* FF30-6 の培養液上清は *M. plutonius* のほか、複数のグラム陽性菌に対して抗菌活性を示した。全ゲノム解析の結果、*Lb. kunkeei* FF30-6 には、最も代表的な乳酸菌バクテリオシンであり、翻訳語修飾によって生じる異常アミノ酸を有するナイシン A に似たペプチドをコードする遺伝子が見出された。精製した活性画分の分子量は 4219.08 であった。この分子量は、先にゲノム情報から見出されたナイシン A 様構造遺伝子を基に、ナイシン A と同様の翻訳後修飾によって生じる、39 アミノ酸残基の成熟型ペプチドから算出される分子量 4218.99 とほぼ一致した。N 末端アミノ酸配列解析では、ナイシン A と同様に、無処理の場合は 1 残基目の Ile のみが検出され、アルカリ還元処理を施した場合は以降もエドマン分解が進行し、30 残基目までが検出された。そのうち翻訳後修飾を受けると推測された 11 残基以外は、塩基配列から推定されるアミノ酸と一致した。また、構造遺伝子周辺には、ナイシン A と同様に、バクテリオシンの翻訳後修飾や分泌、自己耐性への関与が予想される遺伝子群が確認された。

【結論】*Lb. kunkeei* FF30-6 はヨーロッパ腐蛆病菌である *M. plutonius* に抗菌活性を示すバクテリオシンを生産している。このバクテリオシンは 39 アミノ酸残基からなり、ナイシン A と同様に翻訳後修飾による脱水・環化によって生じる異常アミノ酸を有することが推定された。

*Lactobacillus kunkeei*, bacteriocin, nisin A

発表責任者：善藤威史（zendo@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：2C25a02
講演日時：3 月 18 日 09:35～ C 校舎 25 会場

*Leuconostoc* 由来新奇環状抗菌ペプチド、ロイコサイクリシン Q の生合成機構の解析
Characterization of the biosynthetic mechanism of a circular antimicrobial peptide, leucocyclicin Q

○池田 史織[1]、高城 博也[1]、石橋 直樹[1]、善藤 威史[1]、園元 謙二[1,2] ([1]九大院・農、[2]九大・バイオアーク)
○Shiori IKEDA[1], Hiroya TAKI[1], Naoki ISHIBASHI[1], Takeshi ZENDO[1], Kenji SONOMOTO[1,2] ([1]Fac. Agric., Kyushu Univ., [2]Bio-Arch, Kyushu Univ.)

【背景・目的】近年、安全な乳酸菌が産生する抗菌性ペプチドのバクテリオシンに注目が集まっている。特にペプチドの N 末端と C 末端が共有結合した環状バクテリオシンは、耐熱性・耐酸性に優れており、食品保存料や医薬品への利用のみならず、新奇ペプチドの創出に向けたその環化機構の利用も期待されている。しかしながら、環状バクテリオシンの生合成には、自己耐性機構、菌体外分泌、環状化、リーダーペプチドの切断といったプロセスが必要であり、その詳細は未だ明らかにされていない。そこで本研究で、乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* TK41401 が産生する環状バクテリオシン・ロイコサイクリシン Q（LcyQ）の生合成機構の解明を目的とし、生合成遺伝子群の同定、およびそれらの各種異種発現株の LcyQ への自己耐性能と LcyQ 分泌能の評価を行った。
【方法】Inverse PCR 法での塩基配列の解析および MiSeq を用いたドラフトゲノム解析を行った。得られた塩基配列をアセンブル後、LcyQ 構造遺伝子である *lcyQ* 周辺の各 ORF の相同性をデータベースで確認した。次に各遺伝子の機能解析を行うため、推定生合成遺伝子群を様々な組み合わせでプラスミドに挿入し、*Lactococcus lactis* NZ9000 に導入して異種発現株を構築した。これらの株について、Spot-on-lawn 法による LcyQ 自己耐性試験と Direct 法による LcyQ 分泌試験を行った。その後、LcyQ を分泌している可能性が認められた株については、培養液上清から疎水性相互作用クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、逆相 HPLC により精製・濃縮後、ESI-TOF MS による LcyQ の検出をさらに試みた。
【結果および考察】解析の結果、*lcyQBCD* の近傍の約 7 kb の領域に新たに 6 つの遺伝子（*orf5*～*10*）が見出された。種々の組み合わせの異種発現株のうち、*lcyBCD56* を保持した株では生産株と同等の自己耐性が確認された。一方、*lcyBCD5* もしくは *orf6* のみを保持した株でも LcyQ に対する自己耐性が確認されたことから、2 つの自己耐性機構の存在が示唆された。*lcyQBCD56* 保持株では、*Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157$^{T}$ に対する抗菌活性が確認された。培養液上清から精製・濃縮後、環化された成熟型の LcyQ が検出されたことから、*lcyQBCD56* が LcyQ 産生の最小単位であることが示唆された。さらに各生合成遺伝子の機能を明らかにするため、*lcyQBCD56* 保持株のほか、種々異種発現株の菌体内外の画分から直鎖状の前駆体や環状の LcyQ の検出を試みている。

circular bacteriocin, bacteriocin, lactic acid bacteria

発表責任者：善藤威史（zendo@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：2C25a03
講演日時：3 月 18 日 09:50～ C 校舎 25 会場

*Lactococcus* 由来新奇環状抗菌ペプチド、ラクトサイクリシン Q の生合成機構の解析
Characterization of the biosynthetic mechanism of a circular antimicrobial peptide, lactocyclicin Q

高城 博也[1]、○善藤 威史[1]、石橋 直樹[1]、池田 史織[1]、沢 稔彦[1]、園元 謙二[1,2]（[1]九大院・農、[2]九大・バイオアーク）
Hiroya TAKI[1], ○Takeshi ZENDO[1], Naoki ISHIBASHI[1], Shiori IKEDA[1], Naruhiko SAWA[1], Kenji SONOMOTO[1,2] ([1]Fac. Agric., Kyushu Univ., [2]Bio-Arch., Kyushu Univ.)

【背景・目的】バクテリオシンは細菌によってリボソーム上で合成される抗菌ペプチドで、食中毒菌等を含む広範な細菌種に対して抗菌活性を示す。*Lactococcus* 属等の乳酸菌由来のものは生産菌自体の安全性も高いため、とくに食品保存料や医薬品としての利用が期待される。その中でも、N 末端と C 末端がペプチド結合した特異な構造をもつ環状バクテリオシンは高い安定性を有し、とくに広い分野への利用が見込まれる。環状バクテリオシンの生合成には、リーダー配列の切断、環状化、菌体外分泌、自己耐性などの機構が必須と考えられているが、その詳細は不明である。本研究では、*Lactococcus* sp. QU 12 によって生産される環状バクテリオシン lactocyclicin Q（LycQ）をモデルとして、環状バクテリオシンの生合成機構解明を目指し、異種発現系を利用した LycQ 生合成関連遺伝子群の機能解析を試みた。
【方法・結果】先行研究によって LycQ 構造遺伝子（*lycQ*）とその下流の 5 つの遺伝子（*lycB, C, D, E, I*）の計 6 つの遺伝子が LycQ の生合成を担い、*lycI* は単独で LycQ に対する自己耐性を担うことが明らかとなった。そこで、これらの LycQ 生合成遺伝子群について詳細な遺伝子機能解析を試みることとした。構造遺伝子以外の各遺伝子を欠損させたプラスミドを構築し、導入した異種発現株を構築した。これらの株を用いた自己耐性試験の結果、*lycI* を欠損させた場合にも異種発現株は自己耐性能を示し、*lycI* 以外の遺伝子が担う別の自己耐性機構の存在が示唆された。また、LycQ 分泌試験の結果、Δ*lycB* 株にのみ LycQ の分泌が認められ、*lycB* は LycQ 生合成において必須の遺伝子ではないことが明らかとなった。次に、他の環状バクテリオシンの生合成関連遺伝子群との比較から、*lycI* の下流に存在する推定トランスポーター遺伝子群がバクテリオシン分泌量の向上に寄与する可能性が考えられた。そこでこれらの遺伝子を LycQ 異種分泌発現プラスミド（pLY-*QBCDEI*）の下流へ導入した株を構築した。分泌試験を行った結果、顕著な分泌量の増加が認められ、推定トランスポーター遺伝子が LycQ の分泌量向上に寄与していることが示唆された。以上より、LycQ の生合成には、構造遺伝子とその下流の 5 つの遺伝子に加えて計 11 の遺伝子が関与すると明らかとなった。これは、*Lactococcus* 属由来の環状バクテリオシンでは、生合成遺伝子群を同定した初めての例である。また、本分泌発現系の利用により、環状バクテリオシンの将来的な大量生産への利用可能性が示唆された。さらに現在、生合成機構の解明を目指し、各異種発現株の菌体内外画分の分析を試みている。

circular peptide, bacteriocin, lactic acid bacteria

発表責任者：善藤威史（zendo@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：2C25a04
講演日時：3 月 18 日 10:05～ C 校舎 25 会場

*Leuconostoc mesenteroides* 406 および 213M0 は同一のバクテリオシンを産生する
*Leuconostoc mesenteroides* 406 and 213M0 produce identical bacteriocins

○荒川 健佑[1]、羽野 知紘[1]、吉田 早紀[1]、宮本 拓[1,2]、森田 英利[1] ([1]岡山大院環境生命、[2]くらしき作陽大食文化)
○Kensuke ARAKAWA[1], Chihiro HANO[1], Saki YOSHIDA[1], Taku MIYAMOTO[1,2], Hidetoshi MORITA[1] ([1]Okayama Univ., [2]Kurashiki Sakuyo Univ.)

【背景】*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 406 および 213M0 はモンゴル国トゥブ県およびボルガン県の伝統的発酵乳アイラグからそれぞれ分離された乳酸菌であり、ともに幅広い pH 域で抗リステリア活性を示す耐熱性のバクテリオシンを産生する（Wulijideligen *et al.*, *Anim. Sci. J.*, 2012; Arakawa *et al.*, *Anim. Sci. J.*, 2016)。本研究では、両菌株が産生するバクテリオシンの抗菌特性、生合成関連遺伝子群および一次構造について明らかにし、比較することを目的とした。
【方法】まず、406 株と 213M0 株の MRS 液体培地における生育性（培養液 pH、生菌数）とバクテリオシン生産性（抗菌活性）を経時測定し、加えて、24 時間培養時の培養上清の抗菌スペクトル測定を行った。次に、硫安沈殿にて濃縮した培養上清を SDS-PAGE に供した後、*in situ* 抗菌活性測定を行うことで、両菌株が産生するバクテリオシンのサイズ比較を行った。そして、両菌株の全ゲノム解析を MiSeq にて行い、PCR とサイクルシーケンシングによってプラスミドの環化を確認した後、両者のバクテリオシン生合成関連遺伝子群の配列比較を行った。さらに、変異誘発剤処理によって抗菌活性が消失したキュアリング株を両菌株から取得し、それらにおけるプラスミド保有状況を PCR にて確認した。最後に、濃縮培養上清から限外ろ過と逆相クロマトグラフィーを用いて活性分子を精製し、精製画分の N-末端アミノ酸配列分析と質量分析により、両菌株が産生するバクテリオシンの同定を行った。
【結果】MRS 液体培地における生育性およびバクテリオシン生産性は 213M0 株よりも 406 株の方が高かった。抗菌スペクトルの広さは両者で差はなかったが、抗菌強度は 406 株の方が強い傾向にあった。*in situ* 抗菌活性測定においても 406 株の方が強い活性を示したが、バクテリオシンのサイズに差は認められなかった。両菌株の全ゲノム解析（Morita *et al.*, *Genome Announc.*, 2016ab）とサイクルシーケンシングの結果からは、406 株および 213M0 株がそれぞれ 2 および 3 つのプラスミドを保有し、うちそれぞれ 1 つで mesentericin Y105・B105 の生合成関連遺伝子群（*mes*）をコードしていることが明らかとなった。また、213M0 のみ別のプラスミドに同バクテリオシンの分泌遺伝子 *mesDE* をコードしていることも分かった。次に、キュアリング試験において、活性を失った 406 株および 213M0 株由来の変異株がいずれも *mes* をコードするプラスミドを消失していることが示された。さらに、両菌株の活性分子が mesentericin Y105・B105 であることを精製画分の N-末端アミノ酸配列分析と質量分析の結果から確認した。以上のことから、406 株と 213M0 株はともに mesentericin Y105・B105 を産生し、その培養上清における活性差は同バクテリオシンの生産量の差であることが示唆された。

lactic acid bacteria, *Leuconostoc mesenteroides*, bacteriocin

発表責任者：荒川　健佑（karakawa@okayama-u.ac.jp）

講演番号：2C25a05
講演日時：3 月 18 日 10:20～ C 校舎 25 会場

乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* 由来食物繊維、菌体外多糖を介した腸内細菌－宿主糖代謝相互作用連関の解明と機能性食品素材応用

Regulation of host homeostasis via gut microbial metabolites short-chain fatty acids by *Leuconostoc mesenteroides* -derived exopolysaccharides

○久 景子[1,2]、宮本 潤基[3]、清水 祐希[3]、松﨑 千秋[1]、柴田 光治[2]、清水 秀憲[2]、中島 啓[3]、山本 憲二[1]、木村 郁夫[3] ([1]石川県立大 生物資源工学研、[2]日東薬品工業株式会社、[3]東京農工大学 大学院農学研究院)

○Keiko Hisa[1,2], Junki Miyamoto[3], Yuki Shimizu[3], Chiaki Matsuzaki[1], Koji Shibata[2], Hidenori Shimizu[2], Akira Nakajima[3], Kenji Yamamoto[1], Ikuo Kimura[3] ([1]Research Institute for Bioresources and Biotechnology, Ishikawa Prefectural University, [2]Nitto Pharmaceutical Industries, [3]Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology)

**【背景・目的】**近年の腸内細菌叢研究により腸内細菌が宿主のエネルギー調節や栄養の摂取に関与し、肥満・糖尿病に代表されるエネルギー代謝疾患に直接的な影響を及ぼすことが明らかとなった。この中で、腸内細菌叢が宿主糖代謝に影響を及ぼす最大の因子として、食物繊維のような難消化性多糖類から腸内細菌の発酵によって産生される短鎖脂肪酸(SCFA)が注目されはじめた。我々は世界に先駆けて、食物繊維と腸内細菌、SCFA とその宿主受容体を介した代謝機能改善メカニズムを明らかにした（Kimura et al. *PNAS* 2011, *Nat Commun*. 2013）。一方、ある種の乳酸菌は食物繊維である菌体外多糖(EPS; exopolysaccharides)を産生することが知られているが、宿主生体内における詳細な生理作用は不明な部分が多い。この中で我々は独自に、EPS を高産生する乳酸菌、*Leuconostoc mesenteroides* に着目し（Matsuzaki et al. *J Agric Food Chem.*2015）、EPS のデキストラン構造と基質としてのスクロース選択的利用による多糖合成から、宿主の糖代謝との密接な連関、さらには、EPS が難消化性多糖であることから腸内細菌による SCFA 産生を通した宿主恒常性（免疫・エネルギー代謝）に及ぼす影響について検証した。

**【方法】**高脂肪食負荷による肥満誘導マウスへの *Leu. mesenteroides* NTM048 由来 EPS 投与による腸内細菌叢解析、SCFA を含む有機酸分析による発酵パターン解析を行った。また同様に SCFA 受容体 GPR41、GPR43、Olfr78 遺伝子改変マウスを用いた EPS の機能性評価、さらに無菌マウスおよびノトバイオートマウス（*Leu.mesenteroides* NTM048、Bacteroides 属）に、各種糖質（グルコース、スクロース、フルクトース）食負荷による機能性比較評価を実施した。

**【結果・考察】**肥満誘導マウスへの *Leu.mesenteroides* 由来 EPS の投与により、高発酵多糖として既知のフラクトオリゴ糖と比較して、盲腸・糞便中 SCFA の著しい上昇がみられ、また各種代謝改善効果が確認された。一方で、SCFA 受容体遺伝子改変マウスでは、EPS 投与による作用が消失した。さらに、in vitro および in vivo において EPS による *Bacteroides* 属の特異的な増殖が確認され、また *Leu.mesenteroides* も腸内細菌の 1 種であることから、ノトバイオート試験を実施したところ、糖質の違いに伴って宿主糖代謝制御に影響を与えうる可能性が示唆された。以上より、我々は過剰な糖を *Leu.mesenteroides* が EPS に利用することで、宿主側の過剰血糖上昇を抑える宿主共生メカニズムを介した糖代謝制御相互作用機構を解明した。また *Leu.mesenteroides* 由来 EPS という、*Bacteroides* 属の増殖誘導を介し､劇的に腸内 SCFA 産生を高める全く新たなプレバイオティック因子の同定に成功した。

*Leuconostoc mesenteroides*, EPS, short-chain fatty acids

発表責任者：木村郁夫（ikimura@cc.tuat.ac.jp）

講演番号：2C25a06
講演日時：3 月 18 日 10:45～ C 校舎 25 会場

# 細菌の紫色色素，ヴィオラセイン化合物のチロシナーゼ阻害活性

# Tyrosinase Inhibitory Activity of violacein compounds, bcterial purple pigments

安川 卓実、今野 遥夏、○滝口 泰之（千葉工大工）
Takumi YASUKAWA, Haruka KONNO, ○Yasuyuki TAKIGUCHI (Chiba Institute Tech.)

[背景・目的]

皮膚にできるシミなどの色素沈着は，チロシンからメラニンが生成されることにより生じる．チロシンはチロシナーゼによって酸化され, DOPA, DOPAchrome と反応が進んで, メラニンが生成する．そのうち，チロシンから DOPAchrome まではチロシナーゼの寄与が，それ以降は自動酸化の寄与が大きく，チロシナーゼはメラニン生成の律速反応としてはたらく．現在，このチロシナーゼ活性を抑制するものとして，アルブチンなどのフェノール性化合物が報告されている．

本研究は，*Chromobacterium violaceum* VP2 株の生産する青紫色素ヴィオラセインおよびその類縁体であるデオキシヴィオラセイン，オキシヴィオラセインのチロシナーゼ阻害活性について検討を行った．

[方法・結果]

3 種のヴィオラセイン化合物は *Chromobacterium violaceum* VP2 株の培養液の沈殿画分をメタノールで抽出し，トヨパール HW-40F カラムを用いて精製することで調製した．ヴィオラセイン，デオキシヴィオラセイン，オキシヴィオラセインをジメチルスルホキシドに 5～50 μg/ml の濃度で溶解したものを試料溶液とした． 1/15 M リン酸緩衝液(pH6.8)3.2 ml、試料溶液 0.25 ml、マッシュルームチロシナーゼ(1500U/ml) 0.05 ml、チロシン 1.5 ml の順で試験管に加え，37℃，25 分間反応を行った．反応開始時と 25 分後に 484nm の吸光度を測定した．同一試料は同時に 3 本の試験管で行い，平均した．チロシナーゼ活性のコントロールとして β-アルブチンを用いた．ヴィオラセイン化合物および β-アルブチンは濃度依存的にチロシナーゼ活性を阻害した．50 μg/ml のヴィオラセイン，オキシヴィオラセイン, デオキシヴィオラセイン，β-アルブチンのチロシナーゼ阻害率はそれぞれ 63.6%，27.5%，80.2%，38.7%であった． β-アルブチンに比べ，ヴィオラセインは 1.66 倍，オキシヴィオラセインは 0.71 倍，デオキシヴィオラセインは 10.35 倍の阻害活性を示した．チロシナーゼ阻害率はヴィオラセイン化合物のフェノール性水酸基数の少ない順となった．現在，チロシナーゼに対するヴィオラセインの阻害様式の検討を行っている．

violacein, tyrosinase inhibitory activity, Chromobacterium violaceum

発表責任者：滝口　泰之（takiguchi.yasuyuki@p.chibakoudai.jp）

講演番号：2C25a07
講演日時：3 月 18 日 11:00～ C 校舎 25 会場

# 糖を用いた難水溶性色素の包接化及び抗菌活性

Antibacterial activities of poorly water-solubule pigments encapsulated with saccharides.

○川上 玲奈、滝口 泰之（千葉工大）
○Reina Kawakami, Yasuyuki Takiguchi (Chiba Institute Tech.)

［背景・目的］
天然色素には有用なものが多く存在する一方で，難水溶性の試料は溶媒の選択によって使用用途が限られてしまう．そこで糖質をホスト分子，色素をゲスト分子とした包接化合物を作成し，水溶化を向上させることで飲料，インク，薬品としての使用用途を広げると共に水溶化による機能の向上を目的とした．本研究は細菌産生紫色色素ヴィオラセインを糖によって包接化し，その水溶性と大腸菌，枯草菌，黄色ブドウ球菌への抗菌活性を検討している．
［方法・検討］
研究に用いたのはゲスト分子に抗菌作用を持つヴィオラセイン，デオキシヴィオラセイン，ホスト分子としてγ-シクロデキストリン（γCD），β-シクロデキストリン（βCD），ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン（HPCD），β-1,3-1,6 グルカン（グルカン）らを使用した．β-1,3-1,6 グルカンは黒酵母を培養し抽出したものを使用した．そのほかのホスト分子は和光株式会社の特級グレードを使用した．ゲスト分子らは *Chromobacterium* を培養し精製したものを使用した．ゲスト分子とホスト分子を混練法で包接複合体粉末を作製した．作製した粉末を純水に溶解させ，分光光度計で測定しスペクトル遷移を確認した．またヴィオラセイン，デオキシヴィオラセインは共に難水溶性だが，包接複合体水溶液は 500-530 nm 付近の吸収があることから水溶性の向上が見られた．現在，包接複合体中の含有量，溶解度，抗菌性を検討している．

encapsulation, violacein, antibacterial activity

講演番号：2C25a08
講演日時：3 月 18 日 11:15～ C 校舎 25 会場

放線菌 *S. incarnatus* の RNA ポリメラーゼ多重変異の分子構造モデル
DFT calculation for multiple mutation on *S. incarnatus rpoB* gene
○田村 隆[1]、中島 佑里子[1]、平野 敏行[2]、佐藤 文俊[2]、根本 理子[1]、稲垣 賢二[1] ([1]岡山大院・環境生命、[2]東大・生研)
○Takashi Tamura[1], Yuriko Nakashima[1], Toshiyuki Hirano[2], Fumitoshi Sato[2], Michiko Nemoto[1], Kenji Inagaki[1] ([1]Okayama Univ., [2]Univ. Tokyo)

【目的】抗ウイルス，抗原虫活性を示すシネフンギンは，放線菌 *Streptomyces incarnatus* が生産する核酸系抗生物質である。抗ウイルス活性や抗原虫活性など幅広い活性を持つので，ペットの感染症に対する第一処方薬として高い有用性が期待される。しかし，生産性の乏しさのため用途開発がなされていない。本研究グループでは，*rpoB* への多重変異導入による核酸系抗生物質の飛躍的増産を目指して，接合伝達-相同組換えにより *S. incarnatus* の RNA ポリメラーゼ(RNAP)のβサブユニットをコードする(*rpoB*)遺伝子に任意の多重変異を導入するゲノム改変技術を開発してきた。本研究では，RNAP/dsDNA/新生 RNA 鎖の複合体モデルを構築して分子動力学計算で最適化を行い，さらに *rpoB* への多重変異導入効果を RNA ポリメラーゼと DNA/RNA との分子間相互作用の観点から考察した。
【方法】*S. incarnatus* のゲノム配列はすでに解読されており(1)，RNAP 各サブユニットのアミノ酸配列をゲノムの塩基配列から推定した。立体構造の鋳型として高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB27 の RNA ポリメラーゼ/dsDNA/RNA 複合体構造(2o5i.pdb)を用いた。アミノ酸残基の溶媒露出頻度を加味した AladeGap プロトコールを用いて多重配列アライメントを構築した。このアライメント結果を SwissProt にて主鎖モデルを構築した。これに dsDNA/RNA と 2 個の亜鉛配位子を持ち込んで複合体の初期構造モデルとした。さらに統合計算化学システム MOE の Protonate3D を用いて分子内の水素結合，電荷相互作用，van der Waals 相互作用，アミド基やイミダゾール基の互変異性の最適化を行った。このモデル構造を分子動力学計算 Amber 力場計算において 2 フェムト秒刻みのスナップショット構造を 50 万枚連続で作成してこれを 1 ナノ秒間の分子動力学計算を構築した。動的平衡状態に達したところで原子座標の平均を算出して立体構造の妥当性を評価した。【結果および考察】rif-1 クラスター領域を構成する残基群は *S. incarnantus* においては Aps447，Ser453，His457，Arg460 の残基群である。新生 RNA 鎖に最も近傍で直接的な作用する残基は Arg460 で，His457 は水素結合を介して Arg460 と相互作用を持つ。Asp447 と Ser453 も伸長する RNA 鎖と相互作用する極性残基としての位置を占めていた。Rif-1 クラスターへの変異のうち抗生物質の増産効果を示した変異が Cys や Leu など疎水的な残基への置換が高生産をもたらす傾向が報告されており，*rpoB* 変異は RNAP と伸長する RNA との相互作用の最適化を反映している可能性が示唆される。そこで QM 空間を仕切ってモデル化した分子間での相互作用を解析した。本研究は，*rpoB* の改変による二次代謝の活性化機構を電子のレベルで解析する新たな方法論を提供する。

RNA polymerase, Density Function Theory, Nucleoside Antibiotics

発表責任者：田村　隆（tktamura@okayama-u.ac.jp）

講演番号：2C25a09
講演日時：3 月 18 日 11:30～ C 校舎 25 会場

高知県沖海綿に生息する放線菌の多様性と生理活性物質生産能
Diversity and anti-*Mycobacterium* potential of marine sponge-derived actinomycetes from Tosa Bay, Japan

○野田 大貴[1]、木谷 茂[1]、富岡 寿也[1]、ウラノバ ダナ[2]、津田 正史[3]、荒井 雅吉[4]、仁平 卓也[1] ([1]阪大・生物工学国際交流セ、[2]高知大・農林海洋、[3]高知大・海洋コア、[4]阪大院・薬)
○ Hiroki Noda[1], Shigeru Kitani[1], Toshiya Tomioka[1], Dana ULANOVA[2], Masashi Tsuda[3], Masayoshi Arai[4], Takuya Nihira[1] ([1]International Center for Biotechnology, Osaka University, [2]Faculty of Agriculture and Marine Science, Kochi University, [3]Center for Advance Marine Core Research, Kochi University, [4]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University)

【背景】

土壌微生物と知られる放線菌は、多種多様な生理活性物質を生産するため、新規化合物の探索源として長らく利用されてきた。しかし、土壌由来放線菌からは、既知の化合物が再発見される割合が高く、土壌以外に生息する放線菌が次世代型探索源として興味が持たれている。底生海洋生物の 1 つである海綿は強力な生理活性を示す低分子化合物を生産することが知られている。しかし、これらの生理活性物質は海綿に共生する微生物に由来することが最近、明らかとなってきた。また、海綿共生微生物は最大で海綿体積の 40%にも上ることから、海綿は海洋微生物の濃縮体であると言える。したがって、海綿共生放線菌は有望な生理活性物質の探索源と考えられ、その研究が盛んとなってきた。本研究では、高知県土佐湾由来の海綿から単離した放線菌の分類学的多様性と生理活性物質能力を調査することを目的とした。

【方法・結果】

昨年度の本大会にて、土佐湾由来海綿から放線菌様微生物 143 株の分離について報告した。これらの分離株の多様性を検証するため、16S rDNA 塩基配列の系統解析に基づき、分離株の属を同定した。現在までに 131 菌株にて、その 16S rDNA 塩基配列を決定し、相同性解析を行った結果、*Micromonospora* 属がその多くを占めたが、*Streptomyces* 属に加え、希少放線菌である *Blastococcus* 属や *Actinomycetospora* 属、*Saccharomonospora* 属などが分離株に含まれていることが明らかとなり、高知県沖海綿に共生する放線菌の多様性が確認された。分離株の生理活性物質生産能を検討するため、抗菌活性、抗真菌活性、放線菌二次代謝の誘導活性を、培養寒天片または培養抽出物を用いたアッセイと共培養法により、検討した。その結果、分離した海綿共生放線菌の多くが、各種活性を示した。特に、*Streptomyces lividans* TK21 株の二次代謝を誘導する活性を示す菌株や *Mycobacterium smegmatis* や *M. bovis* BCG 株に対する生育阻害活性を示す菌株が得られたことから、これらの海綿共生微生物は新規生理活性物質の有望な探索源になりうることが示唆された。

Sponge, Actinomycetes, *Micromonospora*

発表責任者：木谷茂（kitani@icb.osaka-u.ac.jp）

講演番号：2C25a10
講演日時：3 月 18 日 11:45～ C 校舎 25 会場

*Fusarium graminearum* におけるアミノ酸代謝のトリコテセン生産制御への影響
Effect of amino acid metabolism for trichothecene production by *Fusarium graminearum*
○中嶋 佑一[1]、前田 一行[2]、晋 琦[1]、塩原 拓也[1]、鬼頭 良幸[1]、金丸 京子[1]、小林 哲夫[1]、西内 巧[3]、木村 真[1] ([1]名大院生命農、[2]明治大院濃、[3]金沢大・学際科学)
○Yuichi NAKAJIMA[1], Kazuyuki MAEDA[2], Qi JIN[1], Takuya SHIOBARA[1], Yoshiyuki KITOU[1], Kyoko KANAMARU[1], Tetsuo KOBAYASHI[1], Takumi NISHIUCHI[3], Makoto KIMURA[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Meiji Univ., [3]Kanazawa Univ.)

*Fusarium graminearum*はトリコテセン系マイコトキシン産生し，穀物を汚染する。実験室系での液体培養では単一窒素源としてのアミノ酸の種類に応じて本菌のトリコテセン生産性が変化することが報告されてはいるものの，詳細は不明である。そこで *F. graminearum* を粉砕玄米で培養した際トリコテセン生産に影響を与えるアミノ酸を調査したところ，トレオニン処理区で有意に deoxynivalenol (DON) 型トリコテセン生産が低下することが明らかとなった。トリコテセンクラスター遺伝子の転写活性化に関わる *Tri6* 遺伝子の発現状況を経時的に調べたところ，無処理区では培養開始36時間の段階で *Tri6* 転写活性がピークを示すのに対し，トレオニン処理区ではこのピークが見られず，*Tri6*が転写レベルで抑制されていた。さらにマイクロアレイ解析を行うと，*Tri6* とトレオニン代謝遺伝子との間に負の相関関係が生じていることが見出された。一方，トレオニンを単一窒素源とした液体合成培地を用いた長期のバッチ培養では DON 生産抑制効果が弱いものの，トレオニンを含む新しい培地に植え継ぎ続けることで DON 生産が強く抑制された。このようにトレオニン代謝がトリコテセン生合成制御に影響を与えていることが明らかになったため，現在個体培養のマイクロアレイ解析から得られたトレオニン代謝関連遺伝子の破壊株の作出を試みているところである。

本研究は，農食研究推進事業（Science and technology research promotion program for agriculture, forestry, fisheries and food industry）として行われているものである。

*Fusarium graminearum*, trichothecene production, secondary metabolism

発表責任者：木村 真（mkimura@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2C25p01
講演日時：3 月 18 日 14:00～ C 校舎 25 会場

ミコール酸含有細菌に対する放線菌の網羅的転写応答解析
Trascriptomic responses by *Streptomyces* species agaist intergeneric bacteria
○浅水 俊平、菅井 佳宣、尾仲 宏康（東大院農）
○Shumpei ASAMIZU, Yoshinori SUGAI, Hiroyasu ONAKA (Univ. Tokyo)

ゲノム解析が進み、放線菌には普遍的に多種多数（20-50 個）の二次代謝産物を合成すると推定できる遺伝子群が発見されている。一方でそのゲノム中に見いだされた遺伝子群が何を作るのか？9 割はわかっていないとされている。我々は実験室環境中で 9 割眠る「潜在的」二次代謝産物生合成遺伝子群の中には、自然環境中で他の微生物に由来する刺激により発現するものがあると予想し、実際に実験室環境中においてミコール酸含有細菌を放線菌と共培養することにより、放線菌の小～中分子生産能を大きく変化させる「複合培養」現象を代謝産物レベルで明らかにしてきている（Onaka H., *et al*. *Appl Environ Microbiol*, 2011）。特にミコール酸含有細菌 *Tsukamurella pulmonis* TP-B0596（Tp）は放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)（Sc）との生菌同士のコロニーが接触する領域で Sc の色素生産を強く誘導し、また共凝集形態を生じることが観察されている（Asamizu S., *et al*. *PlosONE*, 2015）。細胞同士が近接した領域で「他者」を感知し、二次代謝のパターンを変えることは放線菌にとって自然環境中の生存戦略として合理的であるように考えられ、このように分子レベルで未解明な興味深い相互作用が多く存在する。異種細菌に対して放線菌が細胞全体としてどのように応答し、また接触依存的な「複合培養」現象がどの程度普遍的であるのかを明らかにすることは、ゲノムに眠る未開拓な二次代謝産物を見出すためにも重要な知見を与えてくれると考えられる。本研究では、ミコール酸含有細菌 Tp と放線菌 Sc の複合培養における Sc の網羅的転写解析を行い、また Tp と Sc に観察される相互作用がどの程度普遍的に観察されるかを解析したので報告する。

Streptomyces, co-culture, secondary metabolism

発表責任者：浅水俊平（asamizu@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2C25p02
講演日時：3 月 18 日 14:15～ C 校舎 25 会場

# 複合培養における放線菌の二次代謝活性化に関与する遺伝子のイオンビームを用いた逆遺伝学的解析

# Interrogating the activation gene factors toward secondary metabolism in actinomycetes by reverse genetic approach using heavy-ion beam mutagenesis

○柳澤 昌臣[1]、浅水 俊平[1]、菅井 佳宣[1]、佐藤 勝也[2]、尾仲 宏康[1] ([1]東大院農、[2]量研機構)
○MASAOMI YANAGISAWA[1], SHUMPEI ASAMIZU[1], YOSHINORI SUGAI[1], KATSUYA SATOH[2], HIROYASU ONAKA[1] ([1]Uviv. Tokyo, [2]QST)

【背景・目的】蓄積されるゲノム解析データから、放線菌は普遍的に多種多様な「潜在的」二次代謝産物生合成遺伝子群を有することが予想されている。我々は「潜在的」休眠遺伝子群の活性化により放線菌の小～中分子生産能をさらに活用したいと考えている。休眠遺伝子群活性化法はいくつか知られているが、中でもミコール酸含有細菌を「活性化パートナー」として放線菌の二次代謝産物生産を誘導する微生物間相互作用を用いた「複合培養」現象に注目している（Onaka H., *et al*. *Appl Environ Microbiol*, 2011）。例えば、ミコール酸含有細菌 *Tsukamurella pulmonis* TP-B0596 (以下 Tp)と *Streptomyces coelicolor* A3(2)（以下 Sc）には Tp 生菌による接触に依存した Sc 二次代謝産物生産や共凝集形態の形成などが観察されており（Asamizu S., *et al*. *PlosONE*, 2015）、分子レベルで未解明な興味深い相互作用が存在する。本研究では、放線菌のミコール酸含有細菌に対する二次代謝産物生産応答に関与する遺伝子を、突然変異株スクリーニングによる逆遺伝学的手法を用いて同定することを目的として行った。
【方法・結果】二次代謝産物の一種である赤色色素生産によりミコール酸含有細菌に応答するモデル放線菌である Sc を用いて解析を行った。胞子（約 $7.0\times10^7$ 個）をシャーレ上の mixed cellulose ester メンブレンに吸着、乾燥させ、カプトン膜によって密封した。イオンビーム照射は、高崎量子応用研究所イオン照射研究施設（TIARA）の AVF サイクロトロンを用い、照射源を重イオン（$^{12}C^{5+}$）とした。照射量は 10~1,000 Gy（エネルギー : 220 MeV、線量率 : $1.25\times10^8$ ion/cm$^2$/sec）の範囲とした。照射量の異なる Sc 突然変異株ライブイラリーから、赤色色素の非誘導生産を指標にした 2 種類のアッセイ（1 と 2）によりスクリーニングを行った。(1) 対峙培養によるスクリーニング；まず初めに寒天培地上に Sc 重イオン照射株（1,000 Gy、生存率 3 %以下）と Tp 株を対峙培養し、Sc の色素生産性を観察し、生産性が変化した株を 18 株（約 6,000 株から）取得した。しかしながら得られた変異株の多くが生育・形態分化にも異型を示したことから、変異箇所が多数に及んでいることが示唆された。(2) 重層培養によるスクリーニング；そこで次に Sc 重イオン照射株（200 Gy、生存率 13 %）を寒天培地上に 60 個程度コロニーが出現するように生育させ、そこにビロード布を用いて Tp をスタンプ法により塗布した。Sc の色素生産性を観察し、これまでに約 70,000 株から生産性が変化した株を約 140 株取得した。今後は、二次選抜による形態観察の後、ゲノムリシーケンス解析により、変異遺伝子の同定を行う予定である。

Combined-culture, Heavy-ion beam mutagenesis

発表責任者：尾仲宏康（aonaka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2C25p03
講演日時：3 月 18 日 14:30～ C 校舎 25 会場

# 薬剤ターゲットを Ffh とするゴードスポリンの新規作用機構解析

# Studies on mode of action of goadsporin, a novel SRP inhibitor peptide

○金田 彬[1]、尾崎 太郎[1]、菅井 佳宣[1]、浅水 俊平[1]、千田 俊哉[2]、尾仲 宏康[1] ([1]東大院農、[2]高エネ研)
○Akira KANADA[1], Taro OZAKI[1], Yoshinori SUGAI[1], Shumpei ASAMIZU[1], Toshiya SENDA[2], Hiroyasu ONAKA[1] ([1]Univ. Tokyo, [2]KEK)

【目的・背景】Goadsporin(GS)は *Storeptomyces* sp. TP-A0584 が生産するペプチドで、生産菌以外の放線菌に対して二次代謝を亢進する作用や抗菌活性を示すことが報告されている。また、GS の生合成遺伝子クラスター内にコードされている自己耐性を担う遺伝子 *godI* が Ffh ホモログをコードしていることや、ゲノム中にもう 1 コピーの *ffh* が存在することから、GS の結合標的が Ffh であり、GodI が GS 耐性型の Ffh であることが予想された。Ffh は 4.5S RNA と共に signal recognition particle (SRP)を形成し、翻訳中のペプチドの N 末端に存在するシグナル配列との相互作用を介してタンパク質の輸送や局在を制御している。これまで SRP を標的とした薬剤は存在しないことから、GS を用いた新規作用機構を持つ抗生物質の開発が期待される。我々はすでに GS 生産菌の Ffh(GsFfh)が GS と相互作用する一方で GodI は相互作用しないことを *in vivo* 及び *in vitro* で報告している（2016 年、日本農芸化学大会)。各菌由来の Ffh を比較したところ、シグナル配列との相互作用に重要なアミノ酸残基として知られる 426 番目のアミノ酸残基が放線菌の Ffh では Ala で保存されており、GS が作用しないグラム陰性菌では Met で保存されていた。さらに GodI では Thr であったことから 426 番目のアミノ酸が GS との相互作用に重要であることが強く示唆された。本研究では複数の微生物由来 Ffh タンパク質に関して GS との相互作用を検証した。
【方法】ジフテリア病原菌 *Corynebacterium diphtheriae*、*Escherichia coli* 由来 *ffh* を His-tag 融合組換えタンパク質として大腸菌で発現させた。各 Ffh タンパク質を Ni アフィニティークロマトグラフィーと陽イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。精製した Ffh をリガンド、GS をアナライトとして表面プラズモン共鳴分析法(Biacore)により相互作用の確認と解離定数（$K_d$）の決定を行った。
【結果】GS は、426 番目のアミノ酸が Ala である *C. diphtheriae* 由来 Ffh（CdFfh）をリガンドとした際に $K_d$=274 nM で結合することが示された。一方で 426 番目のアミノ酸が Met である *E. coli* 由来の Ffh(EcFfh)と GS は相互作用を示さなかった。これらの結果から *Corynebacterium* 属放線菌 Ffh も GS と相互作用することが示され、426 番目のアミノ酸が Ffh と GS の相互作用に重要であることが示唆された。しかしながら、GsFfh と GS の $K_d$が 11 nM であったことから、相互作用には他のアミノ酸残基の影響も存在すると考えられる。現在、結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* 由来の Ffh 等の解析も行っており、あわせて報告する予定である。

goadsporin, signal recognition particle, mode of action

発表責任者：尾仲　宏康（aonaka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2C25p04
講演日時：3 月 18 日 14:45～ C 校舎 25 会場

試験管内完全合成系によるゴードスポリン生合成経路の解析とデザイナーアナログ創製
Dissection of goadsporin biosynthesis by in vitro reconstitution leading to designer analogs expressed in vivo

○尾仲 宏康[1]、尾﨑 太郎[1]、山下 湖奈[1]、後藤 佑樹[2]、下村 杜人[1]、林 昌平[1]、浅水 俊平[1]、菅井 佳宣[1]、菅 裕明[2] ([1]東大農、[2]東大理)
○Hiroyasu ONAKA[1], Taro Ozaki[1], Kona Yamashita[1], Yuki Goto[2], Morito Shimomura[1], Shohei Hayashi[1], Shumpei Asamizu[1], Yoshinori Sugai[1], Hiroaki Suga[2] ([1]Univ. of Tokyo, Agriculture, [2]Univ. of Tokyo, Sciences)

【目的】RiPPs と呼ばれるリボゾーム合成翻訳後修飾ペプチドは二次代謝産物の中で大きなウエイトを占めており、天然物創薬においては重要な骨格の一つである。RiPPs は基質となる前駆体ペプチドがゲノム上に構造遺伝子としてコードされているために、この構造遺伝子の塩基置換を行うことにより容易にアナログ体が産生できる。しかしながら、従来から行われている *in vivo* ベースでの RiPPs アナログ体合成では、アナログ体を産生する遺伝子組換え株の作製やその株の培養ブロスの調製、更には目的のアナログ体産物を同定するための多段階のカラム精製などが障壁となり、ハイスループットスクリーニング系の構築にはほど遠い状況である。そこで、本研究では RiPPs の一種であるゴードスポリン（GS）をモデルにして、無細胞翻訳系と GS 翻訳後修飾酵素(PTM 酵素）を組み合わせた試験管内完全 GS 合成系を構築し、さらにはその系を用い、PTM 酵素群の認識できるアミノ酸配列の同定とその認識ルールに基づいてデザインした「デザイナーGS」の産生を目的とした。
【方法と結果】GS は 6 個のアゾール環や 2 残基のデヒドロアラニン（Dha）、N 末端のアセチル基で高度に修飾されたペプチド骨格を有し、構造遺伝子 *godA* の転写翻訳による GodA の合成及び翻訳後修飾によって生合成される。まず、*in vitro* での完全合成のために無細胞翻訳系として FIT(flexible *in-vitro* translation system)を用い、アゾール環形成酵素 GodD と GodE、Dha 合成酵素 GodF と LazF、N 末リーダー切断酵素 GluC、N 末アセチル化酵素 GodH を FIT に組み込むことによって GS-FIT システムを構築した。T7 プロモーターと *godA* からなる 190 bp の合成 DNA を PCR によって調製し、FIT-GS 系に添加した結果、GS が完全合成される事が LC-MS によって確認できた。そこで次に、全部で 52 種類の変異 *godA* を調製し、前駆体ペプチドの C 末端側 19 残基の翻訳後修飾を受けるコアペプチドと呼ばれる領域の点変異や欠失変異、挿入変異体の解析を行い、アゾール環形成における最小の修飾単位が $X_1$-C/S/T-$X_2$ の 3 残基であることを明らかにした。更にはコアペプチドの中間に $X_1$-C/S/T-$X_2$ 配列を挿入した GodA*-10SA11 を調製し GodD/E による反応を行った結果、挿入した配列における新たなアゾール環形成が検出された。そこで *godA**-10SA11 を *Streptomyces* sp. TP-A0584 株の *godA* 遺伝子破壊株へ導入し、*in vivo* での発現を行ったところ、7 つのアゾール環を有する GS-10SA11 が生産された。また、コアペプチドをタンデムに並べた 38 残基からなる GS-tandem の作製にも成功した。これらの GS アナログ体は PTM 酵素の性質を考慮した上でデザインした新規アナログ体であり、本系を用いることで従来よりも容易にこのようなデザイナーGS の作製が可能となった。

secondary metabolism, peptide antibiotics, Streptomyces

発表責任者：尾仲宏康（aonaka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2C25p05
講演日時：3 月 18 日 15:00～ C 校舎 25 会場

新規 RiPPs-ポリケタイドハイブリット化合物の生合成経路解析
Analysis of the biosynthetic pathway of novel RiPPs-polyketide hybrid compounds
○菅井 佳宣、浅水 俊平、尾仲 宏康（東大院農）
○Yoshinori Sugai, Shumpei Asamizu, Hiroyasu Onaka (Univ. Tokyo)

【背景・目的】リボソーム合成翻訳後修飾型ペプチド (RiPPs) は広範な構造多様性を持つ巨大な天然化合物群の一つである。この中には強力な生理活性を示すものも多く含まれ、有用な医薬探索源とされている。*Streptomyces* sp. TP-A0584 のゲノム中に存在する RiPPs 生合成遺伝子の近傍にはポリケタイドと脂肪酸の生合成に関与する遺伝子が存在しており、興味深いことにこれら生合成酵素が協働してリポペプチド型の二次代謝産物生合成に関与している (2015 年日本農芸化学会大会、2016 年日本放線菌学会大会)。これまで RiPPs とポリケタイドが結合したリポペプチドの報告は無く、その生合成機構に興味が持たれた。本研究ではこの新規ポリケタイド・RiPPs ハイブリッド化合物の生合成経路を解析し、ポリケタイドと RiPPs を結合させる生合成機構の解明を目的とした。
【方法】既に取得していた目的生合成遺伝子クラスターを含むコスミドを放線菌 *Streptomyces albus* に導入し遺伝子クラスターの異種発現を行った。さらに短鎖相同組換えにより各生合成酵素遺伝子を破壊し、同様に異種発現を行なった。各異種発現株の代謝産物を LC-MS 解析することで各遺伝子の目的化合物生合成への関与を確認した。さらに破壊株において蓄積する代謝産物を解析することで本生合成経路の推定を行なった。特に重要だと思われる RiPPs とポリケタイドの結合に関与する酵素に関しては組換え酵素を調製し、*in vitro* での機能解析を試みた。
【結果・考察】目的生合成酵素遺伝子クラスターを含むコスミドを形質転換した *S. albus* 異種発現株は、コントロールには見られなかった 8 種類の代謝産物を生産した。クラスター内に存在する 2 種類の生合成前駆体ペプチドをコードする遺伝子 (*orf10*、*orf11*) のうち *orf10* を破壊したところ、代謝産物が 4 種類に減少した。さらに、脂肪酸部位の酸化還元に関与すると予想された *orf4* と *orf23* を破壊したところ、代謝産物がさらに減少した。このことから、2 種類の前駆体ペプチドから 4 種類の異なる酸化還元段階の代謝産物が生成されることで 8 種類の代謝産物が生合成されると考えられた。さらにクラスター内に存在する機能未知遺伝子 (*orf14*) を破壊したところ、最終産物の RiPPs 部位と分子量が一致する化合物が検出されたことから、この遺伝子がペプチドとポリケタイドを結合させる酵素をコードしていることが示唆された。Orf14 が触媒する反応はこれまでに報告されているペプチドとポリケタイドの結合機構と異なることが予想されたため、現在組換え Orf14 酵素を調製し、*in vitro* での機能解析を進めるとともに、反応機構を解明するために結晶構造解析を行っている。

RiPPs, Polyketide, Biosynthesis

発表責任者：尾仲宏康（aonaka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2C25p06
講演日時：3 月 18 日 15:25～ C 校舎 25 会場

# 微生物由来揮発性有機化合物を指標とした真菌感染症の早期診断法の開発

# Development of the early diagnosis of Trichophytosis with Microbial Volatile Organic Compounds

○伊東 芙美花[1]、首藤 明子[2]、清水 浩美[2]、楊 彩佳[3]、戸根 一哉[3]、槇村 浩一[3]、岩口 伸一[1]([1]奈良女子大学、[2]奈良県産業振興総合センター、[3]帝京大学)
○Fumika ITO[1], Akiko SHUTO[2], Hiromi SHIMIZU[2], Ayaka YOH[3], Kazuya TONE[3], Kouichi MAKIMURA[3], Shin-ichi IWAGUCHI[1] ([1]Nara Women's Univ., [2]Nara Prefectural Institute of Industrial Development, [3]Teikyo Univ.)

真菌感染症の診断に用いられている方法としては培養検査・検鏡が主であるが、サンプルの採取を伴う場合には患者にとって負担となることもある。また、診断を確定するためには時間がかかるという欠点があり、さらに同定技術の習熟も必要となる。特定の病気には特定のニオイがあることが古く知られており、ニオイ成分と疾病との関連性についての研究がこれまでにすすめられてきた。本研究では真菌が二次代謝産物として産生、放出する揮発性有機化合物（microbial volatile organic compounds、MVOCs）が真菌感染症の早期診断に利用可能かどうかについて検討した。本研究の目的は、真菌、もしくは真菌感染者から特異的に放出される化合物の特定、そしてその存在を指標とした非侵襲的で患者への負担が少なく、かつ迅速な真菌感染症の診断方法の開発である。

臨床的な実験を行う前段階として、培地上で菌の培養を行い特異的な MVOCs がみられるかどうかを調べた。使用した菌種は、真菌感染症の中でも最も罹患者数の多い白癬症の代表的な原因菌である *Trichophyton mentagrophytes* 2789 株である。この菌を培養し、コルベン内の気体を TENAX 管に捕集した。このサンプルをガスクロマトグラフ質量分析計（gas chromatograph-mass spectrometer、GC-MS）を用いて測定し、含まれていた化合物を同定した。

GC-MS 測定の結果、長期間の培養、高温でのサンプリングを行った方が化合物は多く検出された。検出された化合物には、Anisole をはじめとした菌株に特異的な化合物が認められた。しかしながら、未同定の物質も多くあり、今後は菌種、菌株や培地の種類を変えて実験を行う必要がある。

MVOCs, diagnosis, dermatophytic fungi

発表責任者：伊東芙美花（qaf_ito@cc.nara-wu.ac.jp）

講演番号：2C25p07
講演日時：3 月 18 日 15:40～ C 校舎 25 会場

# NMR analysis of actinobacterial culture extracts after addition of primary metabolism inhibitor

○Dana Ulanova[1,2], Masashi Tsuda[1,2] ([1]Faculty of Agriculture and Marine Science, Kochi University, [2]Center for Advanced Marine Core Research, Kochi University)

Actinomycetes are potent producers of useful bioactive compounds. However, many natural products have no or low production under standard laboratory conditions, so development of methods to activate or enhance such metabolite`s production is necessary for novel compound discovery. The addition of primary metabolism inhibitors at subinhibitory concentrations affects primary and/or secondary biosynthetic pathways, which can result in increased production of secondary metabolites.[1,2]

In the previous JSBBA meeting, we reported the effect of addition of triclosan, an inhibitor of primary metabolism, on pigment production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). In this study, we continued the analysis of triclosan addition effect on secondary metabolism of actinomycetes. Triclosan was added at subinhibitory concentrations to the liquid cultures of several actinomycete strains. After cultivation, cultures were extracted by ethyl acetate and crude extracts were analyzed by NMR analysis. Here, we report and discuss the results of inhibitor addition assays.

References:

1. Craney et al., Chem Biol, 2012, p.1020
2. Imai et al. Appl Environ Microbiol, 2015 p.3869

actinomycetes, secondary metabolism, NMR

発表責任者：Ulanova Dana（ulanova@kochi-u.ac.jp）

講演番号：2C25p08
講演日時：3 月 18 日 15:55～ C 校舎 25 会場

# 放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) での抗生物質リンコマイシンのホルミシス効果による二次代謝活性化の分子生物学的機構の解析

# Molecular analysis of the activation mechanisms of secondary metabolism by the hormetic effects of lincomycin in *Streptomyces coelicolor* A3(2)

○下野 和真[1]、石塚 美咲[1]、今井 優[2]、越智 幸三[3]、保坂 毅[4] ([1]信大院農、[2]ノースイースタン大、[3]広工大生命、[4]信大バイオメディカル研)
○ Kazuma SHIMONO[1], Misaki ISHIZUKA[1], Yu IMAI[2], Kozo OCHI[3], Takeshi HOSAKA[4] ([1]Shinshu Univ., [2]Northeastern Univ., [3]Hiroshima Institute of Tech., [4]IBS-ICCER, Shinshu Univ.)

【背景・目的】放線菌を低濃度（生育を完全に阻害しない濃度）の抗生物質存在下で培養すると, 同菌の二次代謝能が劇的に向上することがある*。我々の研究室では, 抗生物質がもたらすそのような濃度依存的現象「抗生物質ホルミシス」の仕組みを分子生物学的視点で理解することを目指している。これまでに行った解析から, 抗生物質リンコマイシン（LIN）存在下で放線菌基準株 *Streptomyces coelicolor* A3(2) の二次代謝能が向上する条件で, LIN の非存在下と比較して mRNA 発現量に 2 倍以上の差が生じる遺伝子が約 1 割［828 個（総遺伝子数 8,152 個)］におよぶことを確認した。加えて, そのような大規模な遺伝子発現の変動が LIN 添加 1 分以内ではじまることも明らかにした。これらの事実を踏まえ本研究では, *S. coelicolor* A3(2) での LIN による二次代謝活性化機構を解明する目的で, LIN に応答して同菌の遺伝子発現を即座に変化させる鍵因子の探索を行った。

【方法・結果・考察】*S. coelicolor* A3(2) を MR5 液体培地で対数増殖中期まで振とう培養し, 得られた菌体から, 超遠心分離機を用いた定法により非洗浄リボソームを調製した。LIN（20 μmol）を含む緩衝液中で非洗浄リボソーム（20 $A_{260}$ unit）を 30℃で 2 時間インキュベートし, LIN 処理リボソーム（試料①）を得た。なお, LIN を含まない緩衝液で非洗浄リボソームに同処理を施したもの（試料②）をコントロールとした。試料①と②を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し, 各試料中に含まれるタンパク質の存在量を比較した。その結果, 試料①（LIN 処理リボソーム）で存在量が少なくなっているタンパク質をいくつか検出できた。ペプチドマスフィンガープリンティング法により, それらのタンパク質を同定したところ, RNase J が含まれることが判った。この結果は, LIN により RNase J の局在が変化し得ることを示唆するもので, その変化が同タンパク質の機能発現に影響を及ぼすことが推察された。興味深いことに, *S. coelicolor* A3(2) を LIN（7.1 μg/ml：二次代謝能を向上させる濃度）存在下で培養すると, LIN 非存在下に比べて, 細胞内の rRNA の凝集体の存在量が少ないことも明らかになった。

以上の結果から, LIN 存在下で RNA の分解や凝集を解くことに関わる因子の局在や機能が変化する可能性が見えてきた。現在, RNase J の機能を解析するとともに, rRNA の凝集を解く因子の特定, ならびにそれらの機能変化と遺伝子発現および二次代謝との関連についての詳細な解析を進めている。

【文献】 *Imai, Y. *et al*., *Appl. Environ. Microbiol*., 81:3869-3879 (2015).

Antibiotic hormesis, Secondary metabolism, *Streptomyces*

発表責任者：保坂 毅（thosaka@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2C25p09
講演日時：3 月 18 日 16:10～ C 校舎 25 会場

# 代謝工学によるアスタキサンチン産生海洋性ラン藻の開発と代謝メカニズムの解明

# Development of oceanic cyanobacterium producing astaxanthin through metabolic engineering and elucidation of its metabolic mechanism

○高木 綾湖、蓮沼 誠久、近藤 昭彦（神大イノベ）
○Ayako TAKAKI, Tomohisa HASUNUMA, Akihiko KONDO (Kobe Univ.)

【背景】アスタキサンチンは赤色のカロテノイドであり、養殖魚介類の色調改善剤に広く利用されている。また、強力な抗酸化能を有することから栄養補助剤または食品添加剤としても利用されている。アスタキサンチンは化学合成法による製造も可能であるが、副生成物の混在が問題となるほか、栄養補助剤や食品添加剤としての利用が制限されており、生物資源由来のアスタキサンチンの供給が期待されている。既に緑藻 *Haematococcus pluvialis* による大規模生産が実用化されているが、生育速度が遅いことや休眠細胞を形成するため淡水性雑菌汚染のリスクが高いことが課題となっている。そこで、本研究では海洋性シアノバクテリア *Synechococcus* sp. PCC 7002 を用いたアスタキサンチン生産技術の開発を目指した。*Synechococcus* sp. PCC 7002 は、高塩濃度培養により雑菌汚染のリスクを低減できるだけでなく、光独立栄養条件下での生育が速く、高密度化するため、アスタキサンチンの生産性向上が期待できる。
【方法及び結果】*Synechococcus* sp. PCC 7002 はアスタキサンチンの前駆体であるゼアキサンチンまでしか生合成できないため、相同組換えにより、海洋性細菌 *Brevundimonas* sp. SD212 由来の β-カロテンヒドロキシラーゼ遺伝子（*crtZ*）および β-カロテンケトラーゼ遺伝子（*crtW*）を導入した。4% (v/v) $CO_2$、500 µmol photons $m^{-2}$ $s^{-1}$ の光独立栄養条件で 96 時間培養を行ったところ、遺伝子導入株はコントロール株と比べて約 1.3 倍低いバイオマス生産量を示した。一方、乾燥藻体重量当たりの総カロテノイド含有率はコントロール株と比べて約 2.4 倍高かった。アスタキサンチンは総カロテノイドの 71%であり、8.6 mg/L/day の生産性は *H. pluvialis* での従来の報告を上回っていた。キャピラリー電気泳動質量分析系を用いたメタボローム解析を行っており、*crtZ* および *crtW* の導入が当該シアノバクテリアの中央代謝およびカロテノイド代謝に与える影響についてもあわせて報告する。

cyanobacteria, astaxanthin, metabolic engineering

講演番号：2C25p10
講演日時：3 月 18 日 16:25～ C 校舎 25 会場

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* の細胞集合と胞子成熟の機能経路に関する研究
The research on pathways of cell aggregation and spore maturation in *Dictyostelium discoideum*
○近藤 杏奈[1]、成田 隆明[3]、村田 ちひろ[1]、臼杵 豊展[2]、齊藤 玉緒[2] ([1]上智大学大学院、[2]上智大院、[3]ダンディー大学)
○Anna KONDO[1], Takaaki NARITA[3], Chihiro MURATA[1], Toyonobu USUKI[2], Tamao SAITO[2] ([1]Graduate School of Sophia Univ., [2]Sophia Univ., [3]Dundee Univ.)

【背景・目的】細胞性粘菌*Dictyostelium discoideum*はI型PKSとIII型PKSが融合した新規のポリケタイド合成酵素SteelyAをもつ。その産物である4-methyl-5-pentylbenzene-1,3-diol(MPBD) は発生初期段階では細胞集合を、発生後期においては胞子成熟を制御していることがこれまでの研究により示された。一見すると異なる２つの機能を同一分子がどのように制御しているのか調べることを目的とした。

【方法・結果】細胞集合と胞子成熟のそれぞれのMPBDによる制御機構を調べるにあたり、MPBDの修飾化合物を用いて構造活性相関解析を試みた。4-ethyl-5-pentylbenzene-1,3-diol (EPBD), 4-*n*-propyl-5-pentylbenzene-1,3-diol (PPBD), 1,3-dimethoxy-4-methyl-5-pentylbenzene (diMe-MPBD), and 4-methyl-5-pentylphenol (MPP)は合成したもの、olivetol, orcinolは市販化されているものを使用し、*stlA*欠損株に対しchemotaxis assayと胞子形成の回復実験を行った。その結果、細胞集合では4位のメチル基が、胞子成熟においてはMPBDの1,3位のヒドロキシ基及び4位のメチル基が重要であることがわかった。このことから各機能の作用経路が異なることが示唆された。そこで、機能経路の特定を試みた。MPBDを酸化することで得られるdictyoquinoneが他の粘菌種で細胞集合を引き起こすという報告(Takaya Y etal., 2014)から、*D. discoideum*でも同様なことが言えるのではないかと考え、*D. discoideum*の*stlA*欠損株に対してdictyoquinoneを加えたところ、細胞集合の遅れが回復したが、胞子成熟の欠損は回復しなかった。

これらの結果より*D. discoideum*において発生初期にはMPBDを前駆体とするdictyoquinoneが細胞集合を制御し、胞子成熟はMPBDが直接制御しており、各機能経路が異なることが強く示唆された。

polyketide, stracture-activity relationship, Dictyostelium discoideum

講演番号：2C25p11
講演日時：3 月 18 日 16:50～ C 校舎 25 会場

Curvularia clavata が生産する抗菌性環状ペプチド化合物の生合成遺伝子クラスターの同定
The identification of biosynthetic gene cluster for the antimicrobial cyclic peptide produced by Curvularia clavata.

○山口 滋生[1]、藤岡 智則[1]、吉見 啓[2]、梅村 舞子[4]、町田 雅之[4]、阿部 敬悦[2,3]、河合 清[1] ([1]クミアイ化学、[2]東北大・未来研、[3]東北大院農・生物産業創成、[4]産総研)
○ Shigenari YAMAGUCHI[1], Tomonori FUJIOKA[1], Akira YOSHIMI[2], Myco UMEMURA[4], Masayuki MACHIDA[4], Keietsu ABE[2,3], Kiyoshi KAWAI[1] ([1]Kumiai Chemical Industry Co. Ltd., [2]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [3]NICHe., Tohoku Univ., [4]AIST)

【目的】糸状菌 *Curvularia clavata* が生産する環状ペプチド化合物（以下 KK-1）は、植物病原菌とくに菌類に対して強い殺菌作用を示すことが知られている。しかしながら、農薬として妥当な価格での化学合成が困難であることや、培養によって十分な生産量が確保できないことから産業利用には至っていない。生合成遺伝子群の活性化や適当な異種微生物での発現等による手法を用いることで KK-1 の生産性を飛躍的に向上できる可能性があるが、*Curvularia* 属のゲノムはほとんど解明されていない。そこで本研究では、*C. clavata* の全ゲノムを次世代シーケンサーで解読し、生物情報工学的手法を用いて KK-1 生合成遺伝子クラスターを同定した。
【方法・結果】まず、*C. clavata* のゲノム DNA を 2 種類の次世代シーケンサー(5500xl SOLiD および MiSeq)により解析し、それぞれから得られたリードをハイブリッドアセンブルすることによりゲノム配列情報を得た。次に、このゲノム配列情報から NRPS 遺伝子の探索を行い、KK-1 の構造的特徴と合致したモジュール構造を有する 1 つの NRPS 遺伝子を見出すことに成功した。さらに、本 NRPS の周辺に位置する遺伝子のアノテーション情報を基に、NRPS を含む隣接する 10 遺伝子を KK-1 生合成遺伝子クラスターと推定した。この推定遺伝子クラスターは bZIP 型転写因子（以下 TF）を含んでおり、本 TF が推定遺伝子クラスター全体の発現を制御していると考えた。そこで、本 TF 遺伝子を *C. clavata* の高発現プロモーターにより制御した TF 高発現株を作出し、この株の遺伝子発現を Miseq を用いた RNA-Seq により解析したところ、推定遺伝子クラスターの発現量は野生株と比較して有意に増加しており、培養系内（培養上清＋菌体内）の KK-1 総量についても培養 7 日目時点で野生株の 2 倍程度に増加していた。逆に、本 TF 遺伝子を破壊した株を作出し、この株の遺伝子発現を同様に解析したところ、推定遺伝子クラスターの発現量は野生株と比較して有意に低下しており、培養系内の KK-1 総量は著しく低下していた。これらの結果から、KK-1 生合成遺伝子クラスターの予測は妥当であったことが示され、クラスター内の TF がクラスター遺伝子全体の発現の制御に関与することが証明された。さらに、TF を除く残りのクラスター9 遺伝子の KK- 1 生合成への関与を調べるため、各遺伝子の破壊株を作出し、KK-1 生産量への影響を調べた。その結果、各クラスター遺伝子破壊株において KK-1 の生産量が野生株と比較して有意に低下したことから、これらの遺伝子が KK-1 の生合成に深く関与することが示された。

Fungicide, Cyclic peptide, Nonribosomal peptide synthetase

講演番号：2C25p12
講演日時：3 月 18 日 17:05～ C 校舎 25 会場

麹菌における抗菌性環状ペプチド化合物 KK－1 の異種生産
Heterologous production of the antifungal cyclic peptide, KK-1, in *Aspergillus oryzae*
○吉見 啓[1]、山口 滋生[2]、藤岡 智則[2]、河合 清[2]、町田 雅之[3]、阿部 敬悦[1,4] ([1]東北大・未来研、[2]クミアイ化学工業、[3]産総研・生物プロセス、[4]東北大院農)
○Akira YOSHIMI[1], Shigenari YAMAGUCHI[2], Tomonori FUJIOKA[2], Kiyoshi KAWAI[2], Masayuki MACHIDA[3], Keietsu ABE[1,4] ([1]Tohoku Unik., NICHe, [2]Kumiai Chemical Industry Co.,LTD., [3]AIST, [4]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

【目的】糸状菌 *Curvularia clavata* が生産する環状ペプチド化合物（以下 KK-1）は、植物病原糸状菌に強い殺菌作用を示すことから、抗真菌剤としての応用が期待されている。しかしながら、生産菌での生産量が実用基準に満たないことや生合成経路が未知であることなどから産業利用には至っていない。最近、生産菌 *C. clavata* のゲノム情報が解析され、本化合物の生合成遺伝子がクラスターを形成していることが明らかとなった。本 KK−1 クラスターは、約 40 kb の NRPS 遺伝子を含む 10 遺伝子から構成され、全長約 75 kb からなる巨大なものであった。本研究では、麹菌において KK−1 クラスター中の主要遺伝子を高発現し、KK−1 の異種生産が可能かどうかを明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】まず、約 40 kb の巨大な NRPS 遺伝子を麹菌に導入するため、20 kb の断片に分割して導入する戦略を立てた。麹菌内での遺伝子再構築を想定して、一部をオーバーラップさせた NRPS 前半部分と後半部分を搭載した麹菌用ベクターを構築し、後半ー前半の順に麹菌へと導入した。得られた形質転換体について、PCR によりオーバーラップ部分で相同組換えが生じた株を選抜し、連結部分が正しいことをシーケンス解析により確認した。また、再構築した NRPS 遺伝子の麹菌内での高発現も確認できた（麹菌高発現プロモータ P-*amyB* 制御）。

次に、残り 9 遺伝子のうちクラスター内転写因子とマイナー遺伝子を除く 7 遺伝子について、P-*amyB* 制御により麹菌内で高発現可能なベクターを構築した（3 遺伝子搭載ベクターx1、2 遺伝子搭載ベクターx2 の計 3 種類）。これら 3 種類のベクターを先に作製した麹菌 NRPS 遺伝子発現株に同時に導入し、主要なクラスター遺伝子を全て保持した麹菌株を複数株取得した。これらの菌株について全導入遺伝子の発現を解析したところ、発現量にばらつきは認められるものの全ての菌株で発現が認められ、中でも No.54 株は安定して全遺伝子が高発現していることが明らかになった。

さらに No.54 株を液体振とう培養し、培養系内の代謝物をアセトンおよび酢酸エチルにより抽出した。得られた抽出物について、HPLC により KK-1 の生産性を評価したところ、生産量は低いものの KK-1 の生産が確認された。また、本抽出物は灰色かび病菌に対する抗菌活性を示した。以上の結果から、KK−1 クラスター主要 8 遺伝子の導入により、KK−1 が異種生産可能であることが示された。また、生産菌 *C. clavata* との比較から、麹菌においては、これら主要遺伝子の高発現だけでなく、KK−1 の生産性を制限する要因が存在することも示唆された。現在、生産菌 *C. clavata* と麹菌 KK−1 生産株の RNAseq および代謝解析を計画しており、生産限定要因を明らかにすることで麹菌における生産性向上に寄与する知見を得たいと考えている。

Aspergillus oryzae, non ribosomal peptide synthase, secondary metabolite

発表責任者：吉見啓（a-yoshimi@niche.tohoku.ac.jp）

講演番号：2C25p13
講演日時：3 月 18 日 17:20～ C 校舎 25 会場

# 根の存在下で赤色色素を生産する植物由来放線菌の全ゲノム配列の決定

# Determination of complete genome sequence of red pigment-producing root-associated actinomycete

○石垣 祐二[1]、尾納 隆大[2]、山口 勝司[2]、長谷部 光泰[2]、重信 秀治[2]、白須 賢[1] ([1]理研 CSRS、[2]基生研)
○Yuji Ishigaki[1], Takahiro Bino[2], Katsushi Yamaguchi[2], Mitsuyasu Hasebe[2], Shuji Shigenobu[2], Ken Shirasu[1] ([1]RIKEN CSRS, [2]NIBB)

【背景と目的】

シロイヌナズナから分離された放線菌 *Streptosporangium* sp. AEG048 は、その根の破砕液存在下で赤色色素を生産する。そのため、AEG048 株は植物から何らかのシグナルを受けていると予想され、赤色色素で二次代謝産物の生産が容易に判別可能な AEG048 株は放線菌と植物の相互作用関係を明らかにする良いモデルとなる。一方、*Streptosporangium* 属のゲノムはほとんど明らかにされておらず、*Streptosporangium roseum* でのみ、全ゲノム配列が明らかになっている。そこで、AEG048 株の赤色色素の生合成遺伝子とその制御機構を明らかにするために、Single Molecule Real-Time (SMRT) sequencing が可能な次世代シーケンサーPacBio RS II を用いて全ゲノム配列の決定を行った。さらに、植物と AEG048 株の共培養実験の最適化を行った。

【方法と結果】

*de novo* アセンブリによって単一の contig が得られ、dot plot 解析の結果、約 10 Mb の環状ゲノムであることが明らかになった。ゲノムアノテーションパイプラインである Prokka を用いて解析したところ、9,149 個の遺伝子が存在し、そのうちの 9,010 個がタンパク質をコードすることが予想された。*S. roseum* と AEG048 株のゲノム全体を比較したところ、遺伝子の多くは保存されていたが、転位や逆位などによりゲノム上での位置は異なっていた。さらに、antiSMASH 解析により、28 個の二次代謝遺伝子クラスターの存在が予想された。赤色色素のいくつかは II 型ポリケタイド合成酵素 (PKS) によって生合成されることが知られている。AEG048 株では 2 つの II 型 PKS が存在することが予想されたため、これらの鎖伸長因子 (CLF) の系統解析を行った。その結果、2 つの II 型 PKS は pentangular polyphenol を合成することが予想された。これらのうちの 1 つは遺伝子クラスター内に糖の生合成遺伝子が存在していたことから、配糖体を合成することが推定された。さらに、AEG048 株とシロイヌナズナの共培養を行ったところ、根の先端が赤く染色されていた。

secondary metabolite, symbiosis, plant

講演番号：2C25p14
講演日時：3 月 18 日 17:35～ C 校舎 25 会場

# 島おから由来 GABA 高産生乳酸菌の単離とゲノム解析

Isolation and genomic analysis of GABA high producing Lactobacillus with Shimaokara origin.

○木村 碧樹、多田 一風太、服部 暉、宮城 誠、池松 真也（沖縄高専）
○ Aoki KIMURA, Ipputa TADA, Akira HATTORI, Makoto MIYAGI, Shinya IKEMATSU (National Institute of Technology, Okinawa College)

乳酸菌とは、代謝物として主に乳酸を産生するグラム陽性、通性嫌気性細菌の総称である。ヨーグルトやチーズ、漬物など幅広い発酵食品に用いられている有用微生物であり、整腸作用をはじめ、免疫賦活作用や抗アレルギー作用など多くの機能性が報告されている。亜熱帯地域に属する沖縄県には、温暖で湿潤な気候に適応した乳酸菌が存在していると考えられ、そのような沖縄の風土に合った乳酸菌は沖縄県における産業的利用価値が高いのではないかと考えた。そこで我々は、果樹、土壌、沖縄独自の食品など、沖縄県内の様々なサンプルから乳酸菌を単離し、機能性試験、系統分類、長期保管を行ってきた。

一方、沖縄県には、沖縄独自の製法で製造される島豆腐が存在するが、その製造には原料の大豆が年間 6000t 消費され、副産物のおからは 5000t 生じる。現状、副産物のおからは大部分が 1kg100 円で廃棄され、その処理費用は豆腐業者にとって大きな負担となっている。そこで、近年、代謝におけるアミノ酸の有用性が注目されているので、おからを乳酸発酵させ、有用なアミノ酸を製造することで、「おから」を有効利用できるのではないかと考えた。

以上より、本研究では有効なアミノ酸の一つとして GABA 生産能を指標としスクリーニングを行い乳酸菌を選抜した。

100 株スクリーニングした結果､6 株において高い GABA 生産能確認した｡この 6 株について 16s rRNA 配列解析を行ったところ 6 株全てが *Lactobacillus brevis* であることが分かった。更に上位 4 株に絞りゲノム解析を実施した。GABA 産生に直接関与する遺伝子に違いは見られなかったが、最も GABA 生産能が高い乳酸菌である HT14 株のみ、L-キシルロースの代謝系やビタミン B2 の産生などに関する遺伝子を保有していることが分かった。

以上より、本研究で新たに判明した機能性などを応用し、GABA を強化した島豆腐おからをサプリメントや動物飼料として用いることにより、豆腐業者の負担軽減及び家畜等のブランド化が可能となり、新しい産業として寄与できるのではないかと考えた。

Lactobacillus, genomic analysis, GABA

発表責任者：木村碧樹（br121415@edu.okinawa-ct.ac.jp）

講演番号：2C25p15
講演日時：3 月 18 日 17:50～ C 校舎 25 会場

# HMG-CoA reductase inhibitor FR901512 高生産への鍵遺伝子 SREBPs に関する解析
# SREBPs play an important role for HMG-CoA reductase inhibitor FR901512 high production

○伊東 広哉[1,3]、松井 真[1]、三浦 愛[2]、荒添 貴之[4]、熊谷 俊高[5]、西田 敬二[4]、玉野 孝一[2]、町田 雅之[2,3]、柴田 孝[1,3] ([1]アステラス製薬、[2]産総研、[3]TRAHED、[4]神戸大院科技、[5]ファームラボ)
○Hiroya Itoh[1,3], Makoto Matsui[1], Ai Miura[2], Takayuki Arazoe[4], Toshitaka Kumagai[5], Keiji Nishida[4], Koichi Tamano[2], Masayuki Machida[2,3], Takashi Shibata[1,3] ([1]Astellas Pharma Inc., [2]AIST, [3]TRAHED, [4]Kobe Univ., [5]Fermlab Inc.)

微生物を工業的に利用する際には、目的物質の生産性の高い株や各種ストレスに耐性を持つ株など工業的製造時に有利な形質をもつ菌株を得ることを目的として様々な育種が行われる。育種の方法として UV や NTG を用いた突然変異法がよく用いられているが、次世代シークエンサー（NGS）の登場により簡便にゲノム解析を行うことが出来るようになったことから、今後は遺伝子工学的手法を用いた分子育種が主流になっていくことが予想される。遺伝子組換えによる育種法では、特定の形質のみを付与・除去することが出来るために突然変異法と比較して育種の効率が大幅に向上することが期待できる。本手法を効果的に利用するため、当社で取得した高生産株について、リバースエンジニアリング技術を利用して高生産化・工業生産菌の育種への鍵となる遺伝子の探索を実施している。

Fungus No. 14919 は、HMG-CoA reductase inhibitor である Lovastatin 様構造の PKS 産物、FR901512 を生産する。本菌は、FR901512 の生産性向上を目的として UV 変異による育種が行われており、得られた生産性向上株に対して NGS を用いたゲノムシークエンスとアセンブルを実施し、各変異株の変異点解析を実施した。その結果、ステロール代謝に関与する転写因子 Sterol Regulatory Element Binding Protein（SREBP）の活性化因子 SREBP Cleavage Activating Protein（SCAP）遺伝子にナンセンス変異が導入されており、UV 変異後の株に SCAP を相補すると生産性が UV 変異前の株と同等にまで低下する事を見出した。遺伝子破壊については、*Xylaria grammica* と近縁である本菌では非相同末端修復によるランダム挿入の効率が非常に高く、標的位置での遺伝子破壊が困難であった。しかし、糸状菌で実施例のある Cas9 発現系を用い、一過性発現により標的位置で Double Strand Break を起こす事で、UV 変異前の株に対する SREBP 制御系の破壊株を取得することに成功した。得られた破壊株で有意な生産性向上が確認できた事から、SREBP 制御系が生産性向上の鍵遺伝子である事が示された。遺伝子発現においてもステロール生合成経路中の遺伝子発現が影響を受けている事が確認され、原料である acetyl-CoA が PKS 生産に多く利用される事により生産性向上に繋がっていると考えられる。また、本遺伝子の汎用性を確認するため Lovastatin の生産菌である *Aspergillus terreus* ATCC20542 株に対しても SREBP 制御系の破壊を実施した。その結果、Lovastatin の生産性が向上し、FR901512 生産菌でのみでなく他菌種においても、二次代謝産物（PKS）の生産に SREBP 制御系が汎用性のある鍵遺伝子である事が示された。本研究は、経済産業省委託事業『革新的バイオマテリアル実現のための高機能化ゲノムデザイン技術開発』の一部として実施された。

secondary metabolite, filamentous fungi, genome analysis

発表責任者：伊東広哉（hiroya.ito@astellas.com）

講演番号：2C25p16
講演日時：3 月 18 日 18:05～ C 校舎 25 会場

アキアカネ糞由来 *Pseudomonas* 属細菌のカロテノイド生合成酵素遺伝子の単離・機能解析
Isolation and functional analysis of carotenoid biosynthetic genes of *Pseudomonas* sp. isolated from the Autumn Darter excrement

○深谷 祐貴[1]、竹村 美保[1]、小柳 喬[2]、眞岡 孝至[3,4]、新藤 一敏[5]、三沢 典彦[1]([1]石川県大生資研、[2]石川県大食品科、[3]生産開発研、[4]石川県大、[5]日本女子大家政)
○Yuki FUKAYA[1], Miho TAKEMURA[1], Takashi KOYANAGI[2], Takashi MAOKA[3,4], Kazutoshi SHINDOU[5], Norihiko MISAWA[1] ([1]Res. Inst. Bioresources Biotechnol., Ishikawa Pref. Univ., [2]Dept. Food Science, Ishikawa Pref. Univ., [3]Res. Inst. for Production Development, [4]Ishikawa Pref. Univ., [5]Dept. Food Nutritions, Japan Women's Univ.)

【背景・目的】いくつかのカロテノイドに生活習慣病や発がん予防効果、さらには抗疲労や抗老化作用があることが近年明らかとなり、サプリメントや健康食品として商品化されるようになった。一方で、微量にしか存在しないため、機能が不明なカロテノイドも数多く存在している。これらの中には化学構造上、有用な機能性を持つことが期待されるものも少なからずあり、その大量生産・機能解析が望まれていた。そこで本研究では、そのような珍しいカロテノイドを生体内にもっている節足動物から、カロテノイド生合成酵素遺伝子を単離・機能解析することを目的とした。本研究では、アキアカネ (赤とんぼ) の腸内細菌に注目した。
【方法】アキアカネの新鮮な糞から *Pseudomonas* 属細菌を単離し、ゲノム DNA を抽出し、PCR クローニングによりカロテノイド生合成遺伝子の単離を行った。さらに、2 日間培養した *Pseudomonas* 属細菌または組換え大腸菌からカロテノイドを抽出し、HPLC-PDA (photodiode array) 分析を行った。
【結果･考察】HPLC-PDA 分析から、今回単離した *Pseudomonas* 属細菌(Akiakane 株と命名)が生合成するカロテノイドについては、β-carotene が約 40%、zeaxanthin が約 20%、極性の高いカロテノイドが約 40%を占めることが判明した。なお、本株から *crtX* (zeaxanthin glycosyltransferase) 遺伝子が単離されたことから、極性の高いカロテノイドは配糖体である可能性が高いと思われる。
Akiakane 株の 16S rRNA 遺伝子の配列を解析した結果、*Pseudomonas parafulva* に近縁であることが分かった。そこで、データベース(NZ_KE384443)に登録されている配列を基にプライマーを設計し、PCR クローニングにより Akiakane 株から *crtE*、*crtX*、*crtY*、*crtI*、*crtB*、*crtZ* 遺伝子を単離した。なお、*P. parafulva* では、*crtZ* を除くカロテノイド生合成酵素遺伝子はクラスターを形成していることがわかっているが、Akiakane 株の同遺伝子群については現在、詳細な構造解析を実施している。また、単離したカロテノイド生合成酵素遺伝子の各々を大腸菌発現系に導入し、各遺伝子の機能解析を行った。

Carotenoid, *Pseudomonas* sp., Gene function analysis

発表責任者：三沢　典彦（n-misawa@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：2C26a01
講演日時：3 月 18 日 09:20～ C 校舎 26 会場

# Overexpression of *Chamberlinius hualienensis* hydroxynitrile lyase in *Pichia pastoris* by co-expression of protein disulfide isomerase

○Zhenyu ZHAI[1,2], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., Biotech. Res. Center & Dept. Biotech, [2]ERATO, JST)

**[Introduction]** Hydroxynitrile lyases (HNLs) catalyze the cleavage of cyanohydrins into aldehydes or ketones and hydrogen cyanide. The enzymes also catalyze the reverse reaction and can be utilized to synthesize chiral cyanohydrins, which are important building blocks for the synthesis of fine chemicals and pharmaceuticals in industry. Recently, Dadashipour *et al*. found a novel HNL from *Chamberlinius hualienensis* (ChuaHNL), which shows very high specific activity in the synthesis of (*R*)-mandelonitrile (7,420 U/mg) (1), indicating that the enzyme is an excellent candidate for production of (*R*)-cyanohydrines in industry. However, *C. hualienensis* itself is not suitable for a large-scale preparation of ChuaHNL. Here, we developed a new production method for ChuaHNL using *Pichia pastoris* by co-expression of protein disulfide isomerase (PDI) gene, which catalyzes disulfide formation and isomerization that play an important role in the formation of native disulfide bonds.

**[Result and Discussion]** The ChuaHNL activity of transformants in medium was determined by HPLC method through measuring the (*R*)-mandelonitrile synthesis. We first expressed the original ChuaHNL cDNA in *P. pastoris*. The ChuaHNL production reached the maximum after 6 days of incubation at 28ºC, but the ChuaHNL productivity was very low (18 U/L of medium). Then, we developed a new expression system for high-level production of ChuaHNL using the co-expression of original ChuaHNL cDNA and PDI gene derived from *P. pastoris* (*PpPDI*). By this method, the ChuaHNL productivity increased to 470 U/L of the medium. Optimization of codon usage of ChuaHNL cDNA also contributed to increase the productivity (1,950 U/L and 144 U/mg in the medium). On the basis of these results, we further constructed a new expression system for the production of ChuaHNL by the co-expression of codon optimized ChuaHNL cDNA and *PpPDI*. By this system, the ChuaHNL productivity increased up to 3,170 U/L and 242 U/mg in the medium. The specific activity of purified ChuaHNL obtained by the co-expression system showed 5,056 U/mg of protein. Thus, we successfully constructed the new efficient expression system for a large-scale production of ChuaHNL.

**[Reference]**

(1) M. Dadashipour, Y. Ishida, K. Yamamoto, and Y. Asano, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **112**, 10605-10610 (2015).

Hydroxynitrile lyase, *Chamberlinius hualienensis*, *Pichia pastoris*

講演番号：2C26a02
講演日時：3 月 18 日 09:35～ C 校舎 26 会場

*Pichia pastoris* 発現系を用いた在来ヤスデ由来ヒドロキシニトリルリアーゼの発現
Expression of hydroxynitrile lyase from indigenous millipede in *Pichia pastoris*
○河西 文武[1,2]、Zhenyu Zhai[1,2]、山口 拓也[1,2]、浅野 泰久[1,2]([1]富山県大工・生工研セ、[2]JST ERATO)
○ Fumitake KAWANISHI[1,2], Zhai Zhenyu[1,2], Takuya YAMAGUCHI[1,2], Yasuhisa ASANO[1,2]
([1]Toyama Pref. Univ., [2]ERATO, JST)

【目的】
我々は動植物には高活性な産業用酵素が未開拓で眠っていると考え、その遺伝子資源の探索を行ってきた。その中でヤンバルトサカヤスデ (*Chamberlinius hualienensis*)から単離・同定されたヒドロキシニトリルリアーゼ (ChuaHNL)は既存の植物由来 HNL よりも 5～300 倍の非常に高いマンデロニトリル合成活性 (7,420 U/mg)を持っており、*Pichia pastoris* を用いた異種発現系が適用可能であることを報告している。一方、ヤスデは国内だけでも 200 種以上、世界では 1 万種以上が存在することが知られており、我々が同定した ChuaHNL よりも比活性の高い HNL や基質特異性が異なるなど性質が異なる HNL が存在することが期待される。また酵素の利用には大量発現も必要である。そこで本研究では本邦に在来するタンバアカヤスデ (*Nedyopus tambanus tambanus*)、ウシガエシアカヤスデ (*Nedyopus tambanus mangaesinus*)、ヘラババヤスデ (*Parafontaria falcifera*)、アマビコヤスデの一種 (*Riukiaria* sp.)、ヤケヤスデ (*Oxidus gracilis*)、ミドリババヤスデ (*Parafontaria tonominea*)から HNL の cDNA を単離し、*P. pastoris* 異種発現系で HNL の発現を行った。

【結果】
各ヤスデから単離した HNL cDNA を導入した *P. pastoris* を 7 日間培養し、増殖は濁度で、上清中の HNL 活性はマンデロニトリルの分解活性で測定した。その結果、増殖速度には各群で違いはなかったが、HNL 活性に関してはヘラババヤスデ由来 HNL（PfalHNL）遺伝子導入菌が培養 3 日目から活性を示し、培養 6 日目に最大に達した。また培養 7 日目の上清中に含まれる HNL を Western Blotting で検出したところ、分解活性の結果と同様に PfalHNL 導入菌でのみタンパク質発現を認めた。そこで PfalHNL の培養液中のベンズアルデヒドから(*R*)-マンデロニトリルを合成する活性を測定したところ、培養液 1L 当たりの HNL 産生量は 1,346 U であった。

【考察】
本研究で用いた 6 種のヤスデ HNL の内、PfalHNL が *P. pastoris* 発現系で発現可能であり、在来ヤスデも産業用酵素資源になることを示した。PfalHNL の培養液 1L 当たりの HNL 生産量は既報の *P. pastoris* 発現系での ChuaHNL よりも低い結果であったが、これは今回の検討ではヤスデ由来の HNLcDNA の塩基配列を最適化せずに、*P. pastoris* 発現系に適用したことが一因と思われる。また当日は PfalHNL の温度安定性や pH 安定性などについて検討した結果についても報告する。

Hydroxynitrile lyase, *Pichia pastoris*, millipede

講演番号：2C26a03
講演日時：3 月 18 日 09:50～ C 校舎 26 会場

膵島分離に用いる *Clostridium histolyticum* 由来の臨床用組換え活性型 clostripain の調製
Preparation of clinical recombinant active form clostripain of *Clostridium histolyticum* for islet separation

○前田 浩[1]、村山 和隆[2]、渡邉 君子[3]、後藤 昌史[4]、山形 洋平[1] ([1]東京農工大応生化、[2]東北大院医工学、[3]東北大学未来科学技術共同研究センター、[4]東北大院医・移植再生医学)
○HIROSHI MAEDA[1], KAZUTAKA MURAYAMA[2], KIMIKO WATANABE[3], MASAFUMI GOTO[4], YOUHEI YAMAGATA[1] ([1]Dept. of Applied Biological Science, Tokyo Univ. Agric. Technol., [2]Biomedical Enginnering, Tohoku Univ., [3]NICHe., Tohoku Univ., [4]Transplantation and Regenerative Medicine, Tohoku Univ.)

【背景】 膵島移植とは、インスリン依存糖尿病（1 型糖尿病）に対する治療法の一つである。ドナー膵臓より、酵素を用いて細胞外マトリックスタンパク質を分解し、インスリンを産生するβ細胞を含む膵島のみを分離し、レシピエントの肝内門脈にカテーテルによって注入する細胞移植に分類される、膵臓移植とは異なり低侵襲性な治療法である。膵島は移植後に生着し、血糖値に応じてインスリンを分泌することで、インスリン注射からの離脱による QOL の向上が見込める糖尿病の根治療法である。この膵島移植の成否は膵臓から良質な膵島を大量に分離できるかにかかっている。

膵島分離には *Clostridium histolyticum* の培養上清から調製された酵素剤が用いられていた。この酵素剤には collagenase I/II (ColG, ColH)、neutral protease (NP)、それと Trypsin 様活性を有する cysteine protease clostripain (CP) が含まれているとされていた。これまでに、我々は、2 種のコラゲナーゼと NP を用いた場合では膵島分離効率が低いのだが、さらに CP を添加することで、良質な膵島を高効率で分離できることを見出してきた (1)。以上のことから我々は臨床用組換え活性型 CP の調製方法の確立が必要であると考えた。

【目的・方法】 我々は *Bacillus subtilis* を宿主として用い、BSE 問題を回避するために動物由来の成分を含まない培地を用い、その培養上清からの精製を試みた。また、*C. histolyticum* の培養上清由来の市販の CP 製剤は、使用前に DTT などによって活性中心を還元することで活性化する必要があり、このことは臨床現場における使用のネックとなっている。そこで、我々は臨床使用に耐えうる活性型 CP の調製方法についても検討した。

【結果】 4.6 L の組換え *B. subtilis* 培養上清より 99 mg のエンドトキシンフリーな組換え活性型 CP 精製標品が取得され、さらに本 CP 精製標品は市販の CP 製剤よりも高い比活性を有しているものであった。

次に今回得られた組換え活性型 CP と市販の CP を用いて、基質特異性などの酵素学的性質の決定を行なった中で、これまでの CP 活性の評価に用いていた基質 (Bz-Arg-*p*NA、BAEE (Bz-Arg ethyl ester)) の問題点と、より CP 活性の評価に適した基質を見出したので、それについても提案する。

(1) Dendo M, Maeda H, et al., Synergistic effect of neutral protease and Clostripain on rat pancreatic islet isolation., *Transplantation*, 2015; **99 (7)**: 1349-1355

*Clostridium histolyticum*, islet, purification

発表責任者：前田浩（hmaeda@cc.tuat.ac.jp）

講演番号：2C26a04
講演日時：3 月 18 日 10:05～ C 校舎 26 会場

# 黄麹菌のクチナーゼホモログ遺伝子導入株の作製と酵素の性質

# Preparation of a cutinase homolog gene-introduced strain of Aspergillus oryzae and properties of the enzyme.

○小海 克憲、前橋 健二、柏木 豊（東京農大院・醸造）
○Katsunori Kokai, Kenji Maehasi, Yutaka Kashiwagi (Gra. Sch. Fermentation Sci. Tokyo Univ of Agriculture)

【目的】

麹菌は多種類の酵素を生産するが、脂質関連酵素のうちクチナーゼは、脂質分解、エステル分解の多機能を有するため注目が集まっている。麹菌ゲノム配列情報から *A. oryzae* の cutinaseL1 遺伝子(cutL1)には複数のホモログ遺伝子(DOGAN,NITE AO090011000665、AO090011000113、AO090023000058、AO090003001507)が存在していることが明らかになった。このうち AO090003001507 はトリアシルグリセロールリパーゼ(TglA)としてすでに酵素の性質が報告されていた。[1)] そのため、AO090011000665、AO090011000113、AO090023000058 に着目し研究を行った。これまでに大腸菌発現系で、AO090023000058 の遺伝子産物を発現させ、酵素化学的な性質を検討した。本研究では麹菌組換え発現系によって、これらホモログ遺伝子産物の性質について検討したので報告する。

【方法と結果】

クチナーゼホモログ遺伝子 AO090011000665(cut665)及び AO090011000113(cut113)として、*A. oryzae* RIB40 株のゲノムから PCR 法により、AmyB プロモーター領域、 cut665 遺伝子、 cut113 遺伝子、AmyB ターミネーター領域を取得した。これを pPTRI ベクターに In-fusion クローニングキット(TaKaRa)を用いて連結し、それぞれ cut665 高発現プラスミド、cut113 高発現プラスミドを作製した。

*A. oryzae* RIB40 株の形質転換はプロトプラスト-PEG 法を用いて行った。取得した形質転換株を澱粉添加培地にて発現誘導を行い、合成基質 p-nitrophenyl butyrate(pNPB)を基質として培養上清の酵素活性を確認したところ、cut113 遺伝子導入株はほとんど活性を示さなかった。一方 cut665 遺伝子導入株では宿主株と比較して培養上清中に高い pNPB 分解活性を示した。取得した形質転換株には酵素生産性が大きく異なる株が存在することから、遺伝子の挿入の状態を検討するとともに、現在酵素活性を示すタンパクの性質について検討を行っている。

1) Jinichi Toida, Yukihiko Arikawa, Kimio Kondou, Mikio Fukuzawa, Junichi Sekiguchi: Purification and Characterization of Triacylglycerol Lipase from Aspergillus oryzae, Biosci.Biotechnol.Biochem.,62(4),759-763,(1998)

Aspergillus oryzae, cutinase

発表責任者：柏木豊（y3kashiw@nodai.ac.jp）

講演番号：2C26a05
講演日時：3 月 18 日 10:20～ C 校舎 26 会場

# 組換え氷核タンパク質の発現とその氷核活性について
# Ice nucleation activities of recombinant inaA proteins

○出原 信大、桑原 慎子、鈴木 伸吾、藤川 清三、荒川 圭太（北大農）
○ Nobuhiro IZUHARA, Chikako KUWABARA, Shingo SUZUKI, Seizo FUJIKAWA, Keita ARAKAWA (Hokkaido Univ.)

*Erwinia* 属、*Pseudomonas* 属、*Xanthomonas* 属などの細菌の中には、比較的高い氷点下温度での水の凍結を促進する活性を持つものがあり、氷核細菌と呼ばれている。これらの細菌の氷核活性は、氷核タンパク質によるものであり、遺伝子の塩基配列まで明らかになっているものも多い。その一次構造について、アミノ末端領域とカルボキシ末端領域の間にある、他の氷核細菌においても保存性の高いアミノ酸配列の繰り返し領域が氷核形成に関与すると考えられている。しかし、このタンパク質を単離・精製して解析した例は少ない。

一方、近年の研究において、複数の樹木の木部柔細胞から氷核形成を阻害する物質（氷核形成阻害物質、または過冷却促進物質）が発見された。また、これらの構造類似物質についても氷核形成阻害活性が調べられ、過冷却促進物質と氷核物質の組み合わせによって活性の強さが異なることも示されている。しかしながら、これらの研究では氷核細菌の懸濁液を氷核として用いて活性測定を行っており、過冷却促進物質と氷核タンパク質との相互作用について分子レベルで精査した研究は行われていない。そこで、過冷却促進物質が氷核タンパク質の氷核活性を阻害するメカニズムを明らかにするために、氷核タンパク質の精製を試みるとともに、過冷却促進物質の氷核タンパク質に対する効果についても調べた。

本研究では、大腸菌によるタンパク質発現系を利用して、*E. ananas* 由来の氷核タンパク質 inaA にヒスチジンタグを付した組換えタンパク質（His-inaA）を発現させ、これを氷核物質として用いる実験系を立ち上げることにした。氷核活性を評価する際の凍結温度の測定には熱分析法を用い、PCR チューブに分注した 2μl の試料を 0.2℃/min の速度で冷却しながら、チューブ外面に貼りつけた熱電対によって水の凍結にともなう潜熱の放出を検出することで試料の凍結温度を測定した。まず、His-inaA を大腸菌で発現させたところ、菌体懸濁液が比較的高い氷点下温度で凍結したことから、His-inaA が氷核として機能することが示唆された。次に、この菌体から His-inaA を精製するために、超音波破砕と遠心分離によって細胞抽出液を可溶性画分、膜画分、封入体画分に分画し、それぞれの氷核活性を測定してその分布を調べた。すると、いずれの画分においても氷核活性が見られ、また電気泳動とウエスタンブロッティングにより His-inaA のものと考えられるバンドも検出されたので、これらの画分から His-inaA の精製を試みるとともに、過冷却促進物質との反応も調べた。

ice nucleation activity, inaA, recombinant protein

発表責任者：荒川圭太（keita-ar@for.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：2C26a06
講演日時：3 月 18 日 10:45～ C 校舎 26 会場

*Devosia riboflavina* の二成分型フラビン依存性モノオキシゲナーゼによるリボフラビンの分解
A two-component flavin-dependent monooxygenase degradates riboflavin in *Devosia riboflavina*
○金沢 拓史、桝尾 俊介、高谷 直樹（筑波大・生命環境）
○Hiroshi KANAZAWA, Shunsuke MASUO, Naoki TAKAYA (Univ. Tsukuba)

ビタミンは生物の代謝に必須な微量栄養素であり、サプリメントや食品添加物として利用されている。これまでいくつかのビタミンの分解機構が解明されてきたが、ビタミン B2（リボフラビン）の分解酵素についてはほとんど知られてこなかった。1944 年に Foster によって、リボフラビン分解菌として *Devosia riboflavina* が単離され、その後、柳田らによってリボフラビンをルミクロムへと変換する酵素の同定が試みられたが未だその酵素は発見されていない。本研究では、*D. riboflavina* のリボフラビン分解酵素の同定を目指した。

*D. riboflavina* IFO13584 をリボフラビンを炭素源とした培地で培養し、得られた菌体の破砕液の可溶性画分と不溶性画分のリボフラビン分解活性を測定したところ、後者にのみリボフラビンをルミクロムへと変換する活性が検出された。この活性はリボフラビンを含まない培地で培養した際には検出されなかった。このことから、リボフラビンによって不溶性のリボフラビン分解酵素の生産が誘導されることが示された。この不溶性画分を SDS-PAGE に供したところ、リボフラビンを添加した場合にのみ見られるバンドが検出された。このバンドに対応するタンパク質を MALDI-TOFMS を用いて解析したところ、フラビン依存性モノオキシゲナーゼ（FMO）様のタンパク質であると同定された。ゲノム上でこの遺伝子の周辺にフラビン還元酵素（FR）遺伝子、フラボキナーゼ遺伝子、リボキナーゼ遺伝子が並んで存在しており、これらの遺伝子がリボフラビンの分解に関与していると推察された。FMO または FR を大腸菌で発現させ、得られた 2 種類の組換え酵素を用いた酵素反応によりリボフラビンはルミクロムへ変換された。これにより、*D. riboflavina* は、FMO と FR の二成分型の反応によってリボフラビンを分解することが示された。また、この反応では NADH と FMN が補酵素として効率よく利用された。これらのことから、FR は NADH を利用して FMN を還元し、生成した $FMNH_2$ と酸素分子によって FMO がリボフラビンをルミクロムへと酸化的に分解することが示された。以上の結果から、*D. riboflavina* は二成分型 FMO によってリボフラビンをルミクロムへ変換することが明らかとなった。

*Devosia riboflavina*, Riboflavin, Two-component flavin-dependent monooxygenase

発表責任者：金澤拓史（s1621059@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：2C26a07
講演日時：3 月 18 日 11:00～ C 校舎 26 会場

環状イソマルトオリゴ糖は *Paenibacillus* sp. 598K 由来 GH family 66 デキストラナーゼの生産に 関与する
Cycloisomaltooligosaccharide is involved in production of GH family 66 dextranase from *Paenibacillus* sp. 598K
○水島 大貴[1]、宮崎 剛亜[2]、木村 啓太郎[1]、木村 淳夫[3]、北村 進一[4]、原博 博[3]、舟根 和美[1]([1]農研機構食研、[2]静大グリーン研、[3]北大院農、[4]大阪府大院・生命環境)
○Daiki MIZUSHIMA[1], Takatsugu MIYAZAKI[2], Keitarou KIMURA[1], Atsuo KIMURA[3], Shinichi KITAMURA[4], Hiroshi HARA[3], Kazumi FUNANE[1] ([1]NFRI, [2]Shizuoka Univ., [3]Hokkaido Univ., [4]Osaka Pref. Univ.)

【背景・目的】*Paenibacillus* sp. 598K はデキストラン及び澱粉から環状イソマルトオリゴ糖(CI)を生産する数少ない微生物である。CI はグルコースが α-1, 6 結合した環状糖で、歯垢形成阻害、包接作用等の機能を有することから食品に利用された例もある。これまで我々は、本菌の CI 生成系を解析し、α-1,6 転移活性の強い α-グルコシダーゼ及び CI グルカノトランスフェラーゼが関与して澱粉から CI を生産することを明らかにした。一方、CI 分解・取り込み系は殆ど解析されておらず、最近、菌体内に CI 分解能を有する GH family 66 デキストラナーゼ(PsDEX598)を発見したことが唯一の報告である。本発表では PsDEX598 の生産制御に CI が関与することが示唆されたのでこれを報告する。
【方法】本菌の培養は、LB 液体培地及び 2%(w/v)のデキストラン 40、イソマルトオリゴ糖、澱粉、またはグルコースをそれぞれ含む LB 液体培地、若しくは、任意の濃度の CI を含む LB 液体培地を用いて 30°C、200 rpm で行った。PsDEX598 の生産は、上記の培養上清及び培養菌体抽出液中のデキストラン分解活性を、ブルーデキストラン含有 Native-PAGE 及びデキストラン 40 を基質とした酵素反応により解析した。また、培養上清中の CI 含量は HPLC を用いて定量した。
【結果・考察】培養に用いる糖質の種類が PsDEX598 の生産に影響を及ぼすかどうか解析したところ、デキストラン分解活性は、デキストラン含有培地で培養した菌体抽出液のみで確認された。また、培養上清中の CI 含量は、デキストラン含有培地では最高で 1205 mg/L (1.1 mM)、澱粉含有培地では 40 mg/L (0.04 mM)、一方で、その他の培地では検出されなかった。これらの結果から、デキストラン 40、若しくは、デキストランから生産される CI が PsDEX598 の生産制御に関与することが考えられた。そこで、PsDEX598 の生産制御に与えるデキストランおよび CI の影響について解析したところ、PsDEX598 はどちらの場合においても培養後 3 時間から検出された。しかし、24 時間までに、CI 含有培地の場合では一定した生産を示すのに対し、デキストラン含有培地の場合ではわずかに上昇した。また、培養上清中の CI は、CI 含有培地では 24 時間以内で完全に消費されているのに対し、デキストラン含有培地では培養 3 時間で 76 mg/L (0.07 mM)、培養 24 時間で 1523 mg/L (1.3 mM) まで増加した。このことから、PsDEX598 の生産は CI 濃度に依存して制御されることが推測された。実際に、0.001, 0.01, 0.1, 0.5, 1.0 mM CI 含有培地における PsDEX598 は 0.01 mM から検出され、0.1 mM にかけて顕著に増加した。以上のことから、PsDEX598 の生産は、デキストラン 40 の有無ではなく CI の濃度に依存して制御されることが推定された。

dextranase, glycoside hydrolase family 66, cycloisomaltooligosaccharide

発表責任者：舟根和美（funane@affrc.go.jp）

講演番号：2C26a08
講演日時：3 月 18 日 11:15～ C 校舎 26 会場

# アルカリ耐性を示すα-1,3-グルカン資化性菌の分離

Isolation of alkali-tolerant α-1,3-glucan assimilating bacteria

○矢野 成和[1]、大橋 陽[1]、スヨータ ワサナ[2] ([1]山形大院理工、[2]ソンクラー大農)
○Shigekazu YANO[1], Akira OHASHI[1], Wasana SUYOTHA[2] ([1]Yamagata Univ., [2]Prince of Songkla Univ.)

【目的】α-1,3-グルカナーゼは、糸状菌が生成するグリコシダーゼファミリー71 型（GH 71 型）と、細菌が生成する GH 87 型の 2 種類に分類される（1)。今までに報告されている GH87 型 α-1,3-グルカナーゼのほとんどが、*Paenibacillus* 属細菌由来の酵素である。GH87 型 α-1,3-グルカナーゼはマルチドメイン構造を有しており、数個の α-1,3-グルカン結合ドメイン、機能未知ドメインと触媒ドメインから構成されている(2)。これら酵素の研究は、齲蝕予防の観点と真菌細胞壁溶解に関して行われており、報告された酵素の多くは中性から弱酸性にかけて反応至適 pH を示す。本研究では、未だに明らかになっていない GH87 型 α-1,3-グルカナーゼ反応機構の解明に役立てるため、また、酵素の利用分野拡大を目指して、アルカリ耐性の α-1,3-グルカン資化性菌の探索を行った。さらに、本報では、土壌より分離したアルカリ耐性菌が生成する α-1,3-グルカナーゼを得ることを目的に、培養条件を検討した結果も報告する。

【方法と結果】α-1,3-グルカンを炭素源として pH を 10 に調整した培地で、アルカリ耐性 α-1,3-グルカン資化性菌の探索を行った。70 種類の土壌試料を集めてスクリーニングを行った結果、2 菌株が α-1,3-グルカン含有寒天培地（pH 10）においてハローを形成した。それらを α-1,3-グルカン資化性菌 13A 株と 14B 株とし、16 SrDNA の配列解析を行った結果、 *Paenibacillus* 属細菌に属することが明らかになった。また、既知の α-1,3-グルカン資化性の *Paenibacillus* 属細菌とは別種であることもわかった。これら菌株の培養条件を検討したところ、13A 株と 14B 株ともに、pH 10 に調整した培地よりも pH を 8 から 9 に調整した培地においてより大きなハローを形成することが分かった。以上の結果から、13A 株と 14B 株は、アルカリ条件に耐性を示す新規のα-1,3-グルカン資化性菌であると考え、現在、酵素生産性に優れた培養条件を検討し、さらに、α-1,3-グルカナーゼの精製を行っている。

(1) World J. Microbiol. Biotechnol., 32(2):30, 2016.
(2) Biosci. Biotechnol. Biochem., 77(3), 639-647, 2013.

α-1,3-glucanase, Paenibacillus

講演番号：2C26a09
講演日時：3 月 18 日 11:30～ C 校舎 26 会場

*Enterococcus phoeniculicola* 由来の cellobiose-2-epimerase の精製と諸性質の検討
Purification and characterization of the cellbiose-2-epimrease from *Enterococcus phoeniculicola*
○三野 耕平、ヨッソムバット アッカラピモン、高田 悟郎（香大農）
○Kohei Mino, Akkharapimon Yotsombat, Goro Takata (Kagawa Univ.)

セロビオース 2-エピメラーゼ（CE）とは、セロビオースの還元末端側のグルコース残基をマンノース残基へとエピ化する酵素である。また、セロビオース以外にβ1-4 結合からなるラクトース（乳糖）にも作用する。この酵素は、腸内細菌などの嫌気性菌が保有している報告例が多くあり、難分解性であるマンナンを代謝して行くうえで、使われる酵素の一つである。

本研究では、比較的安全な嫌気性菌である乳酸菌にターゲットを絞り、スクリーニングを行った。結果、乳酸菌の一種である *Enterococcus phoeniculicola* 由来の CE の発現に成功した。そこで、この菌由来の CE の諸性質の検討を行い、既知の酵素との比較を行った。

*Ruminococcus albus* 由来の(CE)の塩基配列を基に、相同性検索を行い最も相同性が高かった *Enterococcus phoeniculicola* ゲノム中に存在する ORF、7 WP_010768278 遺伝子を、発現ベクターと連結し、大腸菌内で発現をさせた。次に、得られた組換え大腸菌から粗酵素を抽出し、酵素活性の測定を行った。また、抽出した粗酵素の精製を行い、諸性質の検討を行った。諸性質の検討は、反応最適温度、最適 pH、温度安定性、pH 安定性、金属イオンの影響、基質特異性について行った。

本酵素は、SDS-PAGE の結果、分子量 46 kD であった。また、精製の結果、比活性はセロビオース、ラクトースそれぞれに対して 15.7 U/mg、14.9 U/mg であった。この場合の酵素活性 1U は、1 分間に 1 μmol のセロビオースをエピ化する酵素量と定義した。そして、最適温度は 35℃、最適 pH はトリス塩酸バッファーの pH 8.0 であった。温度安定性は 30℃、pH 安定性は pH 3.0-9.0 の間で 80%以上の活性を保有していた。また、金属イオンによる酵素活性への影響について、著しく酵素活性が低下した金属イオンは、$Cu^{2+}$, $Zn^{2+}$, $Ag^{+}$であった。キレート剤である EDTA を含む透析液を用いても、その後の活性に影響は見られず、金属イオンの要求性はないものと考えられた。基質特異性は、二糖ではセロビオースおよびラクトースに作用した。他、β1-4 以外の二糖であるマルトースやスクロースに対して、活性は見られなかった。単糖では、六単糖、五炭糖、計 19 種類について検討したが、D-グルコースと D-マンノース間の反応で僅かながら活性が見られた。

cellobiose-2-epimerase

発表責任者：三野耕平（koheimino0106@gmail.com）

講演番号：2C26a10
講演日時：3 月 18 日 11:45～ C 校舎 26 会場

*Vibrio parahaemolyticus* のキチン利用におけるキチン由来オリゴ糖の役割
The role of chitin oligosaccharides in chitin utilization system of *Vibrio parahaemolyticus*
○大久保 学[1]、平野 貴子[2]、袴田 航[1,2]、西尾 俊幸[1,2]（[1]日大院生資科、[2]日大生資科）
○Manabu OKUBO[1], Takako HIRANO[2], Wataru HAKAMATA[1,2], Toshiyuki NISHIO[1,2] ([1]Graduate School of Bioresource Science, Nihon Univ., [2]Nihon Univ.）

【目的】キチンは甲殻類の殻や昆虫の表皮、糸状菌の細胞壁などの主要な構成成分で、*N*-acetyl-D-glucosamin （GlcNAc）がβ-1,4 結合により重合した不溶性多糖であり、地球上でセルロースに次ぐ豊富な生物資源である。一般にVibrio属細菌などの海洋細菌は、キチナーゼを分泌し、海底土壌中に散在するキチンを*N,N'*-diacetylchitobiose［$(GlcNAc)_2$］などのホモオリゴ糖に分解して資化している。しかし一部のVibrio属細菌はキチンオリゴ糖脱アセチル化酵素（COD, EC 3.5.1.105）を分泌し、$(GlcNAc)_2$ の還元末端GlcNAc残基を脱アセチル化し、β-*N*-acetyl-D-glucosaminyl-(1,4)-D-glucosamine（GlcNAc-GlcN）を生産する [1)]。これまでに我々は、GlcNAc-GlcNがCOD生産性Vibrio属細菌に特異的に働くキチナーゼ生産誘導因子や遊走性因子であることを報告してきた [2,3)]。海洋細菌のキチン分解酵素によるオリゴ糖の生産とオリゴ糖濃度勾配に従った菌体の遊走行動は、これらの細菌のキチン利用システムの中で重要であることから、GlcNAc-GlcNはCOD生産性細菌の生理活性物質と考えられる。さらに、これまでの研究でCOD生産性細菌のうち*Vibrio parahaemolyticus* ではGlcNAc-GlcNによりキチナーゼの他にもCODの生産も誘導されることも分かっている [2)]。キチンの代謝には様々な酵素が関与していることから、GlcNAc-GlcNにより他の多くのタンパク質の発現も誘導されると予想した。そこで本研究では、COD生産性細菌であり、全ゲノム配列が判明している*Vibrio parahaemolyticus* RIMD2210633 を用いて、キチン由来の単糖と 2 糖により発現が誘導されるタンパク質の網羅的解析を行った。

【方法・結果】*V. parahaemolyticus* RIMD2210633 を培養して一定の菌量を得た後、GlcNAc、$(GlcNAc)_2$、D-glucosamine、Chitobiose、または GlcNAc-GlcN を含む最少培地でさらに一定時間培養した。そして菌体外画分、菌体内可溶性画分、菌体内難溶性画分をそれぞれ回収し、回収した各画分を SDS-PAGE に供し、銀染色を行った。染色されたタンパクバンドをそれぞれ切り出し、トリプシンを用いてゲル内消化を行った。得られたペプチド断片を LC-MS/MS により分析し、Proteome Discoverer 2.0 を用いてタンパク質の同定と半定量解析を行った。その結果、GlcNAc-GlcN により、キチナーゼや COD の生産だけではなく、細胞外からの物質の取り込みに関わるタンパク質や輸送タンパク質、代謝に関わるタンパク質など、複数のキチン分解関連タンパク質の生産が誘導されていることが示唆された。

1) Kadokura, K. *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*,**75**, 357-365 (2007)
2) Hirano, T. *et al.*, *Glycobioligy*, **19**, 1046-1053 (2009) 3) Hirano, T. *et al.*, *Lett. Appl. Microbiol*. **53**, 161-166 (2011)

Induction of emzyme production, Function of chitin oligosaccharides, Chitin utilization system

講演番号：2C26p01
講演日時：3 月 18 日 14:00～ C 校舎 26 会場

組換え大腸菌におけるエチレングリコールを原料としたグリオキシル酸合成経路の構築
Establishment of synthetic pathway for glyoxylic acid production from ethylene glycol in recombinant *Escherichia coli*
○山下 岳士、山田 美和、下飯 仁、礒部 公安 (岩大農)
○Takeshi YAMASHITA, Miwa YAMADA, Hitoshi SHIMOI, Kimiyasu ISOBE (Iwate Univ.)

【目的】我々は、安価なエチレングリコールを原料とした有用なグリオキシル酸の微生物合成を目指し、3 段階の酵素反応による酸化反応経路を大腸菌に構築することを研究している。当研究室では、2 段階目のグリコールアルデヒドをグリコール酸に変換する可能性がある *Pseudomonas* sp. AIU 362 由来アルデヒド酸化酵素(ALOD)および 3 段階目のグリコール酸からグリオキシル酸への変換が確認されている *Ochrobactrum* sp. AIU 033 由来アルコール酸化酵素(AOD)を見出し、各遺伝子の取得と組換え大腸菌における発現を報告した[1, 2]。本研究ではまず、組換え大腸菌で発現した ALOD がグリコールアルデヒドをグリコール酸に変換できるか確認することを目指した。また、他のグリコール酸供給に関する酵素として、大腸菌内在性のラクトアルデヒドレダクターゼ(FucO)とラクトアルデヒドデヒドロゲナーゼ(AldA)があり、2 種の酵素反応によってエチレングリコールをグリコール酸に変換すると知られている。よって、FucO、AldA、AOD 反応を組み合わせ、大腸菌細胞でエチレングリコールからグリオキシル酸が合成可能であるかについても検討した。
【方法・結果】ALOD がグリコールアルデヒドをグリコール酸に変換できることを確認するため、*Pseudomonas* sp. AIU 362 および pET-ALOD を導入した組換え大腸菌 BL21 (DE3) において ALOD を発現誘導し、酵素精製を行った。原株は 2-メトキシエタノール培地、組換え菌は LB/Amp 培地(0.5 mM IPTG 誘導) で培養した。原株からの ALOD 精製は、35 および 65%硫安塩析と 5 段階のカラムクロマトグラフィーを用いた。組換え菌からの精製は、Ni-NTA アフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いた。酵素活性は、酵素反応で生成した過酸化水素を比色法(555 nm)によって定量し算出した。原株と組換え菌由来 ALOD のグリコールアルデヒド酸化活性を測定した結果、原株由来 ALOD では高い活性が確認され、反応生成物は HPLC 分析によりグリコール酸と同定された。しかし、組換え菌由来 ALOD の活性は非常に低く、$CuCl_2$の添加により活性が復活したが、目的物質のグリオキシル酸にも反応したため、組換え ALOD は目的の系に適していないと考えられた。そこで、大腸菌に内在する FucO と AldA を利用したグリオキシル酸合成経路の構築を目指し、pTA-AOD を導入した組換え大腸菌 BL21 (DE3) を培養し、培養菌 1.5 g と 500 mM エチレングリコールを pH 6.0 で 9 日間反応させた。その結果、2 mM のグリオキシル酸合成が確認され、組換え大腸菌におけるグリオキシル酸合成経路の構築が示唆された。
[1] Y. Sasaki et al., J. Biosci. Bioeng., 114, 28-32 (2012)
[2] M. Yamada et al., J. Mol. Catal. B: Enzymatic, 105, 41-48 (2014)

ethylene glycol, glycolic acid, glyoxylic acid

講演番号：2C26p02
講演日時：3 月 18 日 14:15～ C 校舎 26 会場

*Ochrobactrum* sp. AIU 033 由来アルコール酸化酵素の高機能化
Enhancement of glycolic acid oxidase activity and enzyme productivity of alcohol oxidase from *Ochrobactrum* sp. AIU 033
○松村 健児、山田 美和、西山 賢一、下飯 仁、礒部 公安（岩大農）
○Kenji MATSUMURA, Miwa YAMADA, Ken-ichi NISHIYAMA, Hitoshi SHIMOI, Kimiyasu ISOBE (Iwate Univ.)

【目的】医療、農業、食品工業等幅広い分野で有用なグリオキシル酸の酵素反応による合成を目指して、我々は *Ochrobactrum* sp. AIU 033 由来アルコール酸化酵素(AOD)を見出し、遺伝子取得と組換え大腸菌における発現系の構築を行ってきた [1]。本酵素は、グリコール酸を酸化するがグリオキシル酸を酸化しないため、グリオキシル酸の蓄積に適した性質を有するが、グリコール酸に対する比活性が低いという欠点がある。そこで本研究では、本酵素に遺伝子レベルで変異を導入して変異体ライブラリーを構築し、ユニークな基質特異性は維持しつつ、グリコール酸に対する比活性が向上した変異体の取得を試みた。また、本酵素はαサブユニットの N 末端に Twin-arginine translocation (TAT) シグナルモチーフを有することから、Tat 経路を介して膜透過し、活性型酵素がペリプラズムに局在していると考えられる。そこで、組換え大腸菌での活性型酵素生産量の向上を目指し、膜透過装置である TatABC タンパク質過剰発現株における AOD 遺伝子発現についても試みた。
【方法・結果】
高活性変異体取得については、AOD 遺伝子全域に error-prone PCR によるランダム変異を導入し、AOD 変異体遺伝子ライブラリーを作製した。続いて、変異が導入された遺伝子を In-Fusion Cloning 法により pTA ベクターへ導入し、大腸菌 DH5α を形質転換して、約 880 クローンを得た。さらに、得られたコロニー全てからプラスミド抽出を行い、酵素発現用大腸菌 BL21(DE3)に導入した。形質転換体を 30℃ で 5 mL のアンピシリン含有 LB 液体培地で培養し、6 時間後に 1 mM IPTG を添加し、その後 20 時間培養を行った。集菌後の各変異体を破砕して調製した粗酵素液を用いて、グリコール酸との反応で生じる過酸化水素量を比色法（555 nm）によって測定し、酵素活性を算出した。約 300 株の活性測定を行った結果、野生型の 1.2～1.3 倍の活性を示す 3 株の変異体を取得した。現在、DNA シークエンス解析による変異部位の特定と、残りの形質転換体について活性測定を行っている。また、TatABC タンパク質の過剰発現については、大腸菌のゲノム DNA から PCR によって得られた *tatABC* 遺伝子を pSTV28 ベクターへクローニングし、TatABC 過剰発現用プラスミドを作成した。本プラスミドと pTA-AOD を大腸菌 BL21(DE3)で共発現し、得られた粗酵素液の活性測定を行った結果、TatABC 過剰発現株における粗酵素液の比活性は、非発現株の約 1.6 倍に向上した。よって、TatABC の過剰発現により大腸菌細胞内における活性型 AOD 量が増加したと推定した。
[1] M . Yamada et al., Jornal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 105, 41-48 (2014)

Alcohol oxidase, Glyoxylic acid, Twin-arginine translocation pathway

発表責任者：松村　健児（a8213031@iwate-u.ac.jp）

講演番号：2C26p03
講演日時：3 月 18 日 14:30～ C 校舎 26 会場

補酵素再成系を利用したテトラヒドロクルクミンの効率的酵素生産
Enzymatic production of tetrahydrocurcumin with a coenzyme generation system
○豊田 拓生、橋本 義輝、熊野 匠人、小林 達彦（筑波大院 生命環境）
○Hiroki TOYOTA, Yoshiteru HASHIMOTO, Takuto KUMANO, Michihiko KOBAYASHI (Grad. School of Life and Environ. Sci., Univ. of Tsukuba)

【目的】 植物由来ポリフェノールの一種であるクルクミンは、ウコンから抽出される黄色色素である。薬理学的活性として抗酸化作用、抗炎症作用、抗アミロイド作用などが知られており、近年その生理作用と医学的有用性が盛んに研究されている。クルクミンからジヒドロクルクミン(DHC)を経由してテトラヒドロクルクミン（THC）に変換される経路は同定されているものの、その変換反応に関わる酵素は(微生物からヒトに至るすべての生物において)同定されていなかった状況の中、我々は、腸内微生物である大腸菌がクルクミンを NADPH 依存的に DHC や THC へと代謝する経路をもつことを見いだし、この代謝に関わる酵素を NADPH-dependent curcumin/dihydrocurcumin reductase (CurA)と同定・命名した[1]。クルクミンを基質にした時の本酵素の最終反応産物である THC は通常のクルクミンよりも抗酸化活性が強く、食と医療の両分野で有用な化合物となり得る。既に、pET 発現系を用いて本酵素の大腸菌での大量発現にも成功し[1]、THC を酵素的に合成することが可能となった。しかしながら CurA は NADPH 依存的であるため、THC 大量生産には理論上２倍量の NADPH が必要となる。本研究では効率的な THC 生産を目的とし、NADPH 再生系を導入した大腸菌発現系を利用した検討を行った。

【方法と結果】 CurA によって消費される NADPH を再生供給するために、グルコースと $NAD(P)^+$からグルコノラクトンと NAD(P)H への変換反応を触媒するグルコース脱水素酵素(GDH)の利用を検討した。枯草菌の GDH 酵素遺伝子を PCR 増幅し、pET ベクターと和合性を示すプラスミドを用いて、発現プラスミドを構築した。大腸菌 BL21(DE3)/RIL を宿主として、CurA 発現プラスミドと枯草菌 GDH 発現プラスミドを導入した。IPTG で誘導発現した形質転換体から無細胞抽出液を調製し、SDS-PAGE で両酵素の発現をそれぞれ確認できたことで、両酵素の共発現株の作成に成功した。得られた無細胞抽出液で反応を行った結果、少量の NADPH のみを添加した場合と比べ、グルコースと少量の NADPH の添加時に THC の生産量が増加したため、NADPH 再生系の導入が効果的であることが示唆された。現在、さらなる生成量向上の検討を行っている。

(1) ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA***, **108**, 6615-6620 (2011)

curcumin, bioconversion, *Escherichia coli*

講演番号：2C26p04
講演日時：3 月 18 日 14:45～ C 校舎 26 会場

*Thermus thermophilus* HB8 由来ニコチンアミダーゼの同定と機能解析
Identification and functional analysis of nicotinamidase in *Thermus thermophilus* HB8
○谷口 博範、サングゥワンレック サティダポーン、チョチュワン パチャリン、岡野 憲司、本田 孝祐（阪大・院・工・生命先端）
○Hironori Taniguchi, Sathidaphorn Sungwallek, Phatcharin Chotchuang, Kenji Okano, Kohsuke Honda (Osaka Univ.)

【背景と目的】
$NAD^+$は、酸化還元反応の補酵素として多くの酵素反応に必要とされる重要な物質である。しかし$NAD^+$は、高温においてニコチンアミドと ADP リボースへと容易に分解される熱安定性の低い物質である。高温環境下で生育する好熱菌には、これらの分解産物を出発物質として$NAD^+$を再合成するための発達したサルベージ合成経路が備わっており、de novo 経路に加えて、この再合成経路を用いることで細胞内での$NAD^+$濃度を安定的に維持していると考えられる。

*Thermus thermophilus* HB8 は、80℃以上の高温環境下でも生育が可能な高度好熱性細菌である。本菌の$NAD^+$サルベージ合成経路を構成する酵素群については、ゲノム情報によりその一部が明らかにされている。一方、合成経路の初発反応であり、ニコチンアミドを脱アミノ化し、ニコチン酸へと変換するニコチンアミダーゼをコードする遺伝子に関しては未同定であった [1)]。本研究では、*T. thermophilus* HB8 の$NAD^+$サルベージ合成経路の全容解明に向けた足がかりとして、本菌由来のニコチンアミダーゼの同定および機能解析を行ったので報告する。

【方法と結果】
他の微生物に由来する既知のニコチンアミダーゼのアミノ酸配列をもとに、*T. thermophilus* HB8 のゲノム配列に対する相同性検索を行った。この結果、イソコリスマターゼとアノテーションされていたハイドラーゼドメインをもつ酵素をコードする遺伝子が候補として得られた。当該遺伝子を大腸菌内で発現させ、得られた組換え酵素によるアッセイを行った結果、ニコチンアミドの脱アミノ化活性を確認することができた。また、ゲルろ過クロマトグラフィーによる精製の後、本酵素の $K_m$、$V_{max}$ を決定した。この結果、本酵素がニコチンアミドに対して十分に低い $K_m$ を有することが示され、生体内で$NAD^+$のサルベージ合成経路に関わっていることが強く示唆された。現在、当該遺伝子を欠損した *T. thermophiles* HB8 を作成し、$NAD^+$の熱分解が顕著な高温域における表現型の評価を進めている。

[1)] Honda K et al., (2016) *Metab. Eng.*, 35, 114–120.

nicotinamidase, *Thermus thermophilus*, NAD

発表責任者：本田孝祐（honda@bio.eng.osaka-u.ac.jp）

講演番号：2C26p05
講演日時：3 月 18 日 15:00～ C 校舎 26 会場

アーキアのイソプレノイド合成能を利用した炭化水素生産
Hydrocarbon production utilizing the isoprenoid biosynthetic capacity of Archaea
○佐藤 喬章[1,3]、福家 翼[1]、JHA Savyasachee[1]、TANSENGCO Myra[2]、跡見 晴幸[1,3]（[1]京大工、[2]Industrial Technology Development Institute、[3]JST, CREST）
○ Takaaki SATO[1,3], Tsubasa FUKE[1], Savyasachee JHA[1], Myra TANSENGCO[2], Haruyuki ATOMI[1,3] ([1]Kyoto Univ., [2]Industrial Technology Development Institute, [3]JST, CREST)

【背景・目的】
アーキアは 16S/18S rRNA の配列を基に作成した系統樹において、真核生物や細菌とは異なる第三のドメインを構成している。アーキアは極限的な環境に生育する微生物を多く含むことや他のドメインのものとは異なる特有の代謝機構を有するなど、様々な特徴がある。また、大きな特徴の一つとして膜脂質の構造が挙げられる。真核生物やバクテリアの膜脂質では脂肪酸由来の直鎖状の炭化水素がグリセロールとエステル結合し、疎水性部位を形成している。一方、アーキアの細胞膜脂質の疎水性部位は枝分かれ構造を有するイソプレノイド型炭化水素であり、グリセロールとエーテル結合している。よってアーキアはイソプレノイド型の炭化水素を多量に生産していると考えられる。また、この疎水性部位の基本構造はスクアレンやファイトエンなどの炭化水素と類似している。スクアレンは抗酸化作用を有することから化粧品などに利用されており、またステロイドの前駆体にもなる。一方、ファイトエンは抗酸化作用を有するとともに、あらゆるカロテノイドの前駆体となる。そこで本研究ではアーキアが有するイソプレノイド合成能を利用した、スクアレンやファイトエンなどの炭化水素生産を目指した。

【実験・結果】
炭化水素生産を試みる宿主には、全ゲノム解析が完了しており、遺伝子破壊・導入系が確立されている超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* を用いた。ゲノム解析および既知の膜脂質合成経路から、本菌における膜脂質生合成の中間生成物には、炭素数 15 の farnesyl pyrophosphate (FPP) および炭素数 20 の geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP)が含まれると考えられた。炭素数 30 のスクアレンは squalene synthase (SS)の酵素反応により 2 分子の FPP が縮合して合成される。一方、炭素数 40 のファイトエンは phytoene synthase (PS)の働きにより 2 分子の GGPP が縮合して合成される。しかし *T. kodakaranesis* のゲノム上には SS および PS をコードする遺伝子は見つかっていないため、これらの炭化水素は生合成していないと考えられた。そこで遺伝子導入技術によって他生物由来の phytoene/squalene synthase を導入した。その結果、ファイトエンを産生する *T. kodakarensis* を創出することができた。

Hydrocarbon, Archaea, Isoprenoid

発表責任者：佐藤喬章（takaakisato@sbchem.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2C26p06
講演日時：3 月 18 日 15:25～ C 校舎 26 会場

# *Kocuria-E. coli* シャトルベクターの開発およびキラル化合物生産への応用

Development of biocatalysis for producing chiral compound using novel *Kocuria-E. coli* shuttle vector.

○戸田 弘[1]、小柳 喬[2]、榎本 俊樹[2]、伊藤 伸哉[1] ([1]富山県大・生工研セ、[2]石川県大・生資環)
○Hiroshi TODA[1], Takashi KOYANAGI[2], Toshiki ENOMOTO[2], Nobuya ITOH[1] ([1]Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ., [2]Fac. Bioresour. Environ. Sci., Ishikawa Pref. Univ.)

【目的】近年、環境調和型技術としてバイオプロセスによる物資生産が研究されている。多くの場合、大腸菌が組換え宿主として用いられ、様々な酵素タンパク質の発現や代謝改変等による生体触媒開発が行われている。しかし、疎水性化合物を基質とした有用化合物の生産を目的とする場合、反応系中に高濃度に基質を溶解させることが難しいことや宿主細胞・酵素タンパク質へのダメージが大きいこと、これに伴う触媒菌体の失活が反応持続性を低下させることなどが物質生産効率低下の要因となる。この問題を解決するため、有機溶媒耐性菌を宿主としたバイオプロセス開発も研究されているが、実生産例は少なく未だ発展途上の研究分野である。我々はこれまでに、根圏より単離されたコクリア属細菌 *Kocuria rhizophila* DC2201 を宿主とした有用物質生産プロセスについて研究を行ってきた[1)]。*K. rhizophila* DC2201 は高い耐塩性・有機溶媒耐性を示し、増殖速度が速いこと、公的寄託機関より入手可能でありゲノム配列情報が解析・公開されているなど研究利用のハードルも低い。しかしながら本菌における分子育種ツールはほとんどなく、シャトルベクター開発の特許報告が二例のみである。本研究は、*K. rhizophila* DC2201 を利用した有用物質生産を目標とし、新規なシャトルベクターやゲノム改変ツールの構築を目的として行った。

【実験方法・結果】魚醤より単離されたコクリア属細菌 *K. palustris* IPUFS-1 より、塩化セシウム密度勾配超遠心法を用いて野生型プラスミドを精製した。得られたプラスミド DNA に対し、トランスポゾン挿入キットを用いたプラスミドレスキューを行った結果、いくつかのクローンを得ることができた。これらのプラスミドクローンの塩基配列を解析したところ、最終的に 3 種類の野生型プラスミド(pKPAL1, pKPAL2, pKPAL3)を得ることができた。これらのプラスミド DNA を pHSG298 にサブクローニングし、*K. rhizophila* DC2201 へ形質転換を行ったところ、pKPAL1 および pKPAL3 について形質転換体を得ることができた。続いて、これらのプラスミドの複製最小領域を決定した。pKPAL1 については配列中に複製タンパク質である RepA, RepB をコードする ORF が見出されており、これらの遺伝子を含む領域が複製最小領域であることが確認された。一方、pKPAL3 については推定 ORF が 4 つ存在したが、いずれもプラスミド複製保持には関与しないことが明らかとなった。確定した複製最小領域には ORF は存在せず、代わりに *K. rhizophila* DC2201 のゲノム DNA 配列と相同性を示す配列が存在していた。現在、これらのシャトルベクター[2)]を用いた、各種アルケンから直接キラルアルコールを生産可能なバイオプロセスを構築中である。

1) Toda H., Itoh N., Appl. Environ. Microbiol., 81, 1919-1925 (2015)
2) 伊藤伸哉、戸田 弘、 特願 2016-163072

*Kocuria rhizophila*, styrene monooxygenase, halohydrin dehalogenase

講演番号：2C26p07
講演日時：3 月 18 日 15:40～ C 校舎 26 会場

# プロピオン酸およびコハク酸を用いたポリヒドロキシ酪酸／ポリヒドロキシ吉草酸の蓄積量および比の制御

# Control of the amount and composition of polyhydroxubutyrate/pohydroxyvalerate by using propionic acid and succinic acid as carbon sources

○戎﨑 優子、前田 理久（明治大）
○Yuko EBISUZAKI, Michihisa MAEDA (Meiji Univ.)

*Alcaligenes denitrificans* A41 株は、生体に有害な環境汚染物質である PCB/ビフェニルを分解して炭素源として利用する能力を有する。加えて、この環境汚染物質を炭素源として、生分解性プラスチックとして利用可能なポリヒドロキシアルカン酸(以下 PHA)を生産することができるユニークなバクテリアである。本研究は A41 株の PHA 生産特性(PHA 蓄積率、含有モノマー比率)を炭素源の種類や量によって制御することを目指している。今回は、プロピオン酸を含む炭素源を用いたときの PHA 生産特性を解析した。A41 株において生合成が確認されている PHA モノマーは 3-ヒドロキシ酪酸(3HB)および 3-ヒドロキシ吉草酸(3HV)である。これまでに窒素制限下でコハク酸あるいはビフェニルを単一炭素源として培養すると、3HB が高い割合を占める PHBV を生産することが確認されているが、物性上の短所がある。3HB モノマー比率の高い PHBV の固くて脆い力学的な弱さを克服するために、3HV モノマー比率を高くすることを目的とした。その戦略として 3HV モノマーの代謝前駆体であるプロピオニル CoA の細胞内濃度を上昇させるために、プロピオン酸を含む炭素源を用いて PHA 生産を行った。

プロピオン酸およびプロピオン酸を含む炭素源について、増殖特性を解析した。*A. denitrificans* A41 株のプロピオン酸資化能について調べたところ、単一炭素条件下ではあまり良好な生育を示さず、特に濃度の影響を受けた。コハク酸と組み合わせることで良好な PHA 生産性を示した。そこでバイオマス準備工程及び PHA 生産工程におけるそれぞれのプロピオン酸およびコハク酸の最適重量比を検討して培養を行い、ガスクロマトグラフィーによって PHBV 蓄積量および 3HB/3HV の解析から評価した。バイオマス準備工程、PHA 生産工程間で、コハク酸とプロピオン酸の重量比を変えることで、PHA 生産特性に差異が見られた。バイオマス準備工程にコハク酸とプロピオン酸を共存させた培養条件では高い PHA の蓄積率が見られた。特に PHA 生産工程をプロピオン酸単一炭素条件で培養したことで、高い 3HV モノマー比を得られた。バイオマス準備工程にコハク酸 0.25%とプロピオン酸 0.25%、PHA 生産培養にプロピオン酸 0.5%を添加した培養条件では 42.6%と最も高い 3HV モノマー比が得られた。

現在は PHBV の電子顕微鏡写真やプラスチックとしての物性と、3HB、3HV モノマー比との関係性を調べていくこととともに、*A. denitrificans* A41 株の PHA 合成経路に関連する代謝経路について研究を行っている。

polyhydroxyalkanoate, propionic acid, 3-hydroxyvalerate

講演番号：2C26p08
講演日時：3 月 18 日 15:55～ C 校舎 26 会場

酵素法によるイミダゾールジペプチドの生産
Biocatalytic production for imidazole dipeptide
○駒林 卓磨、橋田 紋佳、紫牟田 ひな子、木野 邦器（早大理工・応化）
○Takuma KOMABAYASHI, Ayaka HASHIDA, Hinako SHIMUTA, Kuniki KINO (Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

【背景・目的】イミダゾールジペプチドは抗酸化作用を有し、疲労回復効果がある化合物として注目されている。ニワトリ等の家畜の筋肉からの抽出法による生産が主流であるが、低収率、高コストなどの点から新たな生産法が求められている。L-アミノ酸リガーゼ（Lal）はATPの加水分解と共役して無保護のアミノ酸同士を特定の順序で結合してジペプチドを合成する反応を触媒する。*Bacillus subtilis*由来のLalであるYwfEは、β-AlaをN末端側基質として、L-ヒスチジン（L-His）をC末端側基質として認識してカルノシン（β-Ala-His）を合成することが報告されている[1)]。構造類似体である他のイミダゾールジペプチドのアンセリン（β-Ala-3-methyl-L-His）やバレニン（β-Ala-1-methyl-L-His）についても酵素生産の可能性が考えられた。そこで、本研究では、カルノシンに加えアンセリンおよびバレニンのLalによる合成確認と酵素法による効率的なイミダゾールジペプチドの生産法の確立を目指して、改変酵素による活性評価を行った。
【方法・結果】YwfE の N 末端側基質をβ-Ala とし、C 末端側基質として L-His や 3-methyl-L-His もしくは 1-methyl-L-His を用いて 30℃, 20 h で精製酵素反応を行った。カルノシンとアンセリンは HPLC、バレニンは LC-MS により分析し、生成物の確認を行った。その結果、YwfE はカルノシンのみならずアンセリンとバレニンに対しても合成活性を有することが明らかとなった。そこで、イミダゾールジペプチド合成活性の向上を目指して YwfE に対して部位特異的変異導入の検討を行った。YwfE の結晶構造情報（PDB ID:3VMM）とこれまでに蓄積した Lal の構造・活性相関に関する知見を踏まえ、変異導入候補となるアミノ酸残基の選定を行った。計 33 種類の一変異型酵素を創製し、カルノシン合成活性を評価したところ、378 位の His を Arg に置換した H378R が生成量 7.8 mM と最も高く、次いで 108 位の Asn を Ala に置換した N108A が 7.2 mM であった。この二重変異体である N108A/H378R では 8.6 mM（収率 68.8%）とさらに向上した。一方、アンセリン合成では N108A は 8.2 mM と高い数値を維持したが、H378R は 5.1 mM と低く、二重変異体では N108Q/I112V が 9.8 mM（収率 78.4%）と生成量が最も多かった。標品が準備できなかったバレニンに関しては、反応物の LC-MS 解析によりバレニンの生成を確認することができた。酵素法によるアンセリンおよびバレニンの直接合成は初の報告となる。
1) 協和発酵バイオ株式会社, 特開 2013-81405.

carnosine, anserine, imidazole dipeptide

発表責任者：駒林 卓磨（4baplnybhsr@asagi.waseda.jp）

講演番号：2C26p09
講演日時：3 月 18 日 16:10～ C 校舎 26 会場

# 枯草菌の NRPS 合成酵素を用いたアミド化合物の合成

# Amide compound synthesis by a bacillibactin synthetase of *Bacillus*

○安部 智子[1]、橋本 義輝[2]、杉本 さやか[2]、小林 健太[1]、熊野 匠人[2]、小林 達彦[2]([1]東電大・理工、[2]筑波大院・生命環境)
○Tomoko ABE[1], Yoshiteru Hashimoto[2], Sayaka Sugimoto[2], Kenta Kobayashi[1], Takuto Kumano[2], Michihiko Kobayashi[2] ([1]School of Sci. and Eng., Tokyo Denki Univ., [2]Grad. School of Life and Environm. Sci., the Univ. of Tsukuba)

我々は以前、アシル CoA 合成酵素が CoA 以外にも L-システインを基質にすることができ、さらに、(本来の酵素活性である) チオエステル結合 (-CO-S-) 形成だけでなく、アミド結合 (-CO-NH-) 形成をも触媒することを明らかにした [1)]。アシル CoA 合成酵素は、脂肪酸と CoA のチオエステル結合形成を触媒してアシル CoA を合成する酵素である。CoA に代わるチオール化合物が基質になり得るかについての報告はこれまで無く、また、アミド結合 (-CO-NH-) 形成を触媒するという報告ももちろん無かったため、上記の結果は驚くべきことであった。アシル CoA 合成酵素は Aadenylate-forming enzyme スーパーファミリーに属している。このスーパーファミリーには、アシル CoA 合成酵素以外に、リグニンの形成に関与する 4-クマル酸:CoA リガーゼやホタルルシフェラーゼ、抗生物質の生合成等に関与する Nonribosomal peptide synthetase (NRPS) のアデニレーションドメイン等が属している。我々は近年、上記のスーパーファミリーに属する DltA という酵素を用いて本新規反応の反応機構を解析した。その結果、本反□ は□ □ □ □ と□ □ □ □ がカップリングしたユニ□クな□ □ で□ □ することを□ らかにし、□ 規な酵素-化学カップリング連続反応機構を提唱した [2)]。また、その反応機構から、本スーパーファミリーに属する多くの酵素が本新規反応を触媒できる可能性が考えられた。

枯草菌の Bacillibactin は鉄キレート剤の 1 種であり、いくつかの NRPS 酵素によって合成される二次代謝産物である。Bacillibactin の生合成に関わる酵素の 1 つである DhbE は、2,3-Dihydrobenzoic acid (2,3-DHB) を、チオエステル結合を介して別の NRPS 酵素 DhbB に付加する反応を触媒する。DhbE 遺伝子をプラスミドにクローン化し、大腸菌に導入して大量発現系を構築した。大量発現させた DhbE を精製し、それを用いて DhbE の新規反応を検討した結果、反応の進行を示唆する AMP の増加が確認された。各種 HPLC カラムを用いて産物の探索および分離を行い、LC-MS/MS を用いて反応産物を同定したところ、これまでに調べた他の Adenylate-forming enzyme スーパーファミリーに属する酵素と同様に、DhbE は L-システインを基質にすることができ、さらに、アミド化合物を合成できることを明らかにした。

1) *J. Biol. Chem.* 283, 11312 (2008)

2) *J. Biol. Chem.* 291, 1735 (2016)

amide compound, peptide bond, adenylate-forming enzymes

講演番号：2C26p10
講演日時：3 月 18 日 16:25～ C 校舎 26 会場

# 脂肪酸アシル-AMP 合成酵素を利用した脂肪酸アミド合成

# Fatty acid amide synthesis using fatty acyl-AMP ligase

平井 健吾[1]、○鈴木 伸[1]、原 良太郎[2]、木野 邦器[1,2] ([1]早大・先進理工・応化、[2]早大・理工研)
Kengo HIRAI[1], ○Shin SUZUKI[1], Ryotaro HARA[2], Kuniki KINO[1,2] ([1]Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ.)

【目的】アミド結合は、タンパク質や生理活性ペプチドをはじめ化成品など多くの機能性化合物を合成するうえで重要である。しかし、触媒的なアミド結合形成反応が工業的に確立されている例は少なく、実用化につながる新たな手法の開発が期待される。このような背景において、我々は、非リボソーム型ペプチド合成酵素(NRPS)のアデニル化ドメイン(Aドメイン)を利用するアミド化合物の触媒的合成に成功している[1)]。本反応では、基質アミノ酸のカルボキシ基のアデニル化と、それに続くアミンによる求核置換反応によってアミド結合が形成される。これは、基質のカルボキシ基を酵素的にアデニル化できれば、求核性の高いアミンを作用させることで任意のアミド化合物が合成可能であることを示唆している。本研究では、この特徴的な反応の展開を図るために、細胞表面の複合脂質合成に関与するfatty acyl-AMP ligase (FAAL)に着目した。当該酵素は、脂肪酸のカルボキシ基をアデニル化する酵素であるため、NRPSのAドメインを利用したときと同様の反応機構で脂肪酸アミドの合成が可能であると予想し、検討を行った。

【方法・結果】*Mycobacterium smegmatis* $mc^2155$由来FAALは、$C_6$-$C_{10}$の広範な脂肪酸に対してアデニル化活性を有することを見出した[2)]。そこで、$C_6$-$C_{10}$の脂肪酸を基質とし、求核剤にはL-Proや直鎖状アミンおよび環状アミンを用い、ATPならびに$MgSO_4$存在下で反応を行った。反応後、HPLC分析を行ったところ脂肪酸アミドと推定されるピークを検出し、MS分析においても予想される脂肪酸アミドの分子量とよく一致した。本結果から、アデニル化した脂肪酸にアミンを作用させることで、その組み合わせに対応する脂肪酸アミドの合成が可能であることが示された。例えば、FAALの基質としてdecanoic acid ($C_{10}$)を用い、L-Proを求核剤として反応させた場合、生成するdecanoyl-L-Proの収率は約40%であった。また、本反応は求核剤のキラリティーに関係なく進行した。本研究で構築したアミド結合形成反応によって、多様な脂肪酸アミドの合成が可能になるものと期待される。NRPSのAドメインを利用したアミノ酸アミドの合成に加え、FAALによる脂肪酸アミドの合成を可能とする本手法は、触媒的アミド化合物の合成に向けた新たな手法として提案できる。

1) R. Hara, *et al*., *Anal.Biochem*., **477**, 89-91 (2015)
2) 平井ら, 日本生物工学会大会2016年度講演要旨集, 2P-1p006

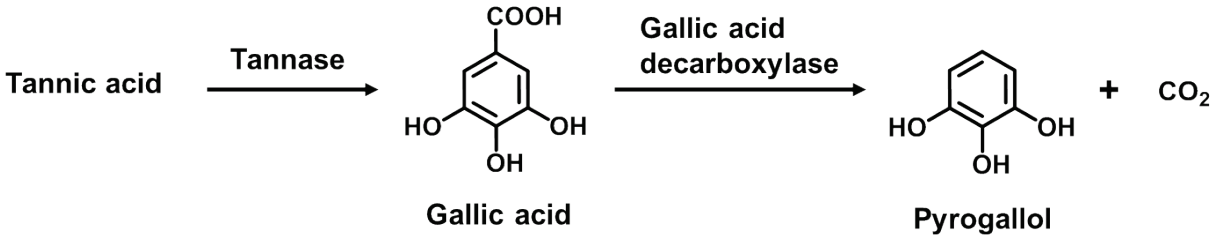
fatty acyl-AMP ligase, amide bond formation, fatty acid amide

発表責任者：木野　邦器（kkino@waseda.jp）

講演番号：2C26p11
講演日時：3 月 18 日 16:50～ C 校舎 26 会場

*Rahnella* sp. Y77 によるピロガロールの酵素合成
Enzymatic synthesis of pyrogallol using *Rahnella* sp. Y77
○大江 史花[1]、岡村 佳樹[1]、満倉 浩一[2]、吉田 豊和[2] ([1]岐阜大院・工・生命工、[2]岐阜大・工・化生工)
○Fumika Oe[1], Yoshiki Okamura[1], Koichi Mitsukura[2], Toyokazu Yoshida[2] ([1]Grad. Sch. Eng., Gifu Univ., [2]Dept. Chem. and Biomol. Sci., Eng., Gifu Univ.)

【目的】 ピロガロールは医薬品合成中間体などに幅広く用いられている。再生可能資源であるタンニン酸を加水分解して得られる没食子酸が脱炭酸されると、ピロガロールが生成する。タンニン酸のエステル結合を加水分解する酵素タンナーゼは、細菌やカビに幅広く見出されている。一方、没食子酸脱炭酸酵素は、*Pantoea* 属や *Enterobacter* 属など腸内細菌に活性が分布している。没食子酸脱炭酸酵素は酸素感受性が強く、失活しやすい酵素である。今回は、高活性を示す微生物を探索し、ピロガロールの合成を検討した。




【方法と結果】 タンニン酸あるいは没食子酸を単一炭素源とする集積培養を行ない、没食子酸脱炭酸酵素活性を示す微生物を 32 株分離した。ピロガロール生成活性を休止菌体反応で評価し、最も高い活性を示した Y77 株を選択した。16S rDNA 解析から Y77 株は *Rahnella* に属すると同定した。Y77 株の無細胞抽出液を調製し、酵素活性の安定性を評価したところ、4℃で 6 日間の保存後においても細胞破砕直後の活性と同程度の活性を示した。タンニン酸あるいは没食子酸を基質とし、Y77 株の休止菌体を用いてピロガロール合成を検討した。リン酸緩衝液（pH 7.0）中で、基質 200 mM の酵素変換を行った。タンニン酸からピロガロールは 84.8 mM (10.7 g/L)生成し、変換率は 42 %であった。没食子酸を用いた場合、速やかに脱炭酸反応が進行し、変換率 92%で 183 mM (23.1 g/L)のピロガロールが蓄積した。

References:
1) M. Zeida, M. Wieser, T. Yoshida, T. Sugio, T. Nagasawa, *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 4743-4747(1998).
2) M. Soni, K. Prakash Shrama, S. Kaushik, P. J. John, *Int. J. Biosci.*, **12**, 97-104 (2012).

decarboxylase, pyrogallol, *Rahnella* sp.

発表責任者：大江史花（u3125008@edu.gifu-u.ac.jp）

講演番号：2C26p12
講演日時：3 月 18 日 17:05～ C 校舎 26 会場

# 微生物電気化学法による空気中の窒素からのアンモニア生産

# Ammonia production from atmospheric nitrogen using bioelectrochemical system

○滝沢 宏次、高妻 篤史、渡邉 一哉（東薬大生命）
○Koji TAKIZAWA, Atsushi KOUZUMA, Kazuya WATANABE (Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.)

［背景・目的］ハーバー・ボッシュ法によって工業的に生産されるアンモニアは人類にとって重要な化学物質であり、工業原料や肥料等として大量に利用されている。しかし、本手法によるアンモニア合成は高温高圧条件で行われるため、多大なエネルギーを必要とすることが課題となっている。そのため、温和な条件でアンモニアを合成するための化学触媒や、微生物を利用したアンモニア生産（生物学的窒素固定）が検討されている。一方、近年独立栄養微生物を利用した有用物質の生産に関する研究が盛んに行われている。独立栄養微生物は炭素源として糖などの基質を必要とせず、二酸化炭素などの無機化合物から炭素源を得ることができることから、従属栄養微生物を利用する場合と比べて安価な物質生産が期待できる。我々は窒素固定が可能な独立栄養微生物として、好酸性鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* に着目している。一般的に独立栄養微生物は増殖速度が遅い点が課題となるが、*A. ferrooxidans* は電気化学培養法（電極から増殖に必要な電子を供給する培養法）により効率的に増殖させることができる。そこで本研究では、*A. ferrooxidans* を用いて電気と空気からアンモニアを合成するバイオプロセスの構築を目指した。
［方法・結果］大量のエネルギーと還元力を必要とすることから、一般的に微生物による窒素固定は厳密に制御されており、過剰なアンモニアは生産されない。微生物を用いてアンモニアを生産するためには、窒素固定系の抑制を解除する必要があると考えられた。今までの土壌細菌などの解析から、アンモニア同化の生成物であるグルタミンが細胞内窒素量を感知するためのシグナル分子として働くことが知られている。そこで本研究では、グルタミン合成酵素の阻害剤である L-methionine sulfoximine (MSX)を用い、*A. ferrooxidans* の窒素固定系の抑制解除を試みた。まず MSX が *A. ferrooxidans* の生育に与える影響を調べた結果、本株の生育は MSX の添加によって著しく抑制され、MSX が *A. ferrooxidans* においてもアンモニア同化阻害剤として機能することが示された。また培地中に $NH_4^+$が存在する条件下 MSX を添加すると、窒素固定系遺伝子の発現およびニトロゲナーゼ活性が上昇した。以上の結果は、MSX が $NH_4^+$の同化を抑制し、その結果ニトロゲナーゼ遺伝子が恒常的に発現されることを示している。そこで、MSX を添加して *A. ferrooxidans* の電気化学培養を行いアンモニアの蓄積を調べたところ、MSX の添加後に $NH_4^+$が培地中に蓄積することが確認された。以上の結果は、*A. ferrooxidans* を用いた微生物電気化学培養法により、電気と空気からアンモニアが合成できることを示している。

ammonia, bioelectrochemical system, *Acidithiobacillus ferrooxidans*

発表責任者：滝沢　宏次（s116130@toyaku.ac.jp）

講演番号：2C26p13
講演日時：3 月 18 日 17:20～ C 校舎 26 会場

# 酵素法によるヒドロキシリジンの製法開発

# Development of biocatalytic production process for hydroxylysines

○原 良太郎[1]、林 拓人[2]、三宅 良磨[3,4]、川端 潤[3,4]、木野 邦器[1,2] ([1]早大・理工研、[2]早大理工・応化、[3]三菱化学科学技術研究センター、[4]エーピーアイコーポレーション)
○ Ryotaro HARA[1], Takuto HAYASHI[2], Ryoma MIYAKE[3,4], Hiroshi KAWABATA[3,4], Kuniki KINO[1,2] ([1]Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [3]Mitsubishi Chemical Group Science and Technology Research Center, [4]API Corporation)

【背景・目的】キラル化合物には医薬中間体として有用なものが多いが，特定の異性体のみを選択的に合成する技術の開発は合成化学における重要な課題である。酵素を利用したバイオプロセスは化合物に対する選択性が高く，高価なキラル触媒や特殊な反応条件を必要としないため，キラル化合物の効率的な生産への応用が期待され，工業的な利用価値が高い。グリシンを除くタンパク質性アミノ酸はそれ自体が有用キラル化合物であるが，官能基の付加により不斉を導入することでさらに利用価値が高まる。そこで，酵素の利点を生かしたキラル化合物の合成に有用なアミノ酸水酸化酵素に着目した。当該酵素を用いると，従来の化学合成法では選択的な合成が困難なヒドロキシアミノ酸を一段階で合成可能となる。我々は，微生物が潜在的に有するアミノ酸水酸化酵素の探索と機能解析を通してさまざまなアミノ酸水酸化酵素を取得し，ヒドロキシアミノ酸の生産を実証してきた。本研究では，最近見出したリジン水酸化酵素を利用したヒドロキシリジン（Hyl）の効率的な製法開発を目指した。

【方法・結果】我々は，リジンを位置・立体選択的に水酸化し，(2*S*,3*S*)-3-ヒドロキシリジン（3-Hyl）を合成可能な酵素を 2 種類，(2*S*,4*R*)-4-ヒドロキシリジン（4-Hyl）を合成可能な酵素を 4 種類，それぞれ異なる微生物から見出している [1)]。これら酵素の反応特性を利用し，リジン水酸化酵素発現大腸菌を触媒とした微生物変換反応を行い，150 mM のリジンからほぼ収率 100%で 3-Hyl および 4-Hyl の生産を達成している [2)]。本発表では，さらに生産効率を高めるべく，酵素，反応条件，基質濃度を検討した。はじめに，3-Hyl および 4-Hyl それぞれの生産に適した酵素の選択をおこなった。大腸菌の休止菌体系において，Hyl の生産速度，効率を評価し，生産に最適な酵素を決定した。次に，反応条件を検討した。水酸化酵素は酸素添加酵素の一種であり，反応液中の溶存酸素を利用するため，通気撹拌条件が反応効率に影響すると予測した。そこで，試験管，フラスコ，ジャーファーメンターでの反応を実施し，その効果を検証した。さらに，基質濃度を検討した。基質となるリジンと 2-オキソグルタル酸の濃度を 50 mM から段階的に上げ, Hyl の合成量を評価した。その結果, 3-Hyl 生産は 300 mM 以上，4-Hyl 生産は 200 mM 以上の生産性を示した。これにより，酵素法によるきわめて効率的な Hyl 生産プロセスの構築に成功した。

1) 日本農芸化学会 2015 年度大会（3A34a07） 2) 日本生物工学会 2016 年度大会（1P-1p022）

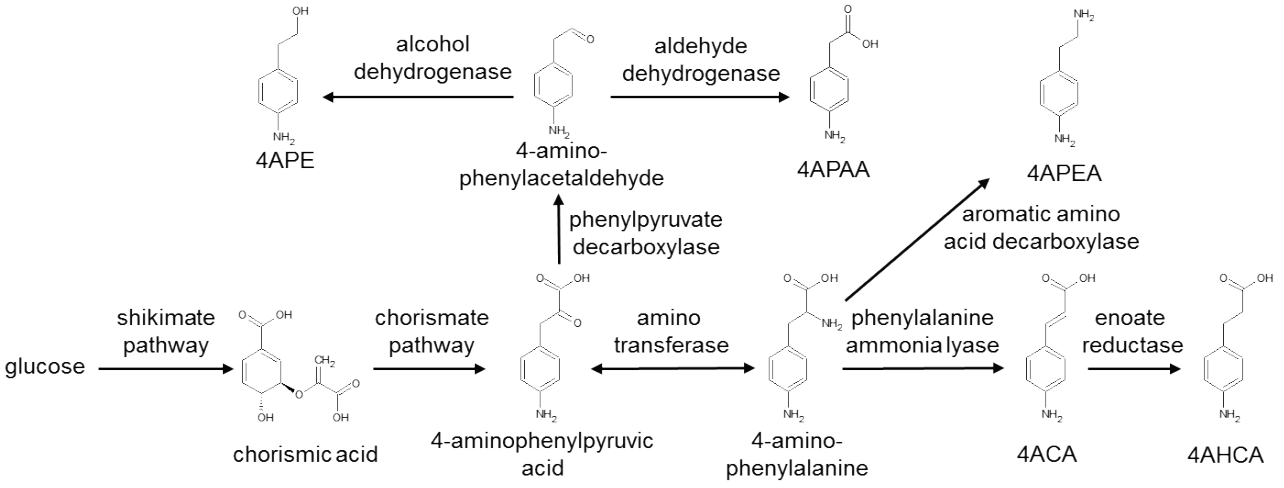
hydroxylysine, lysine hydroxylase, 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase

発表責任者：原 良太郎（ryo_h@aoni.waseda.jp）

講演番号：2C26p14
講演日時：3 月 18 日 17:35～ C 校舎 26 会場

芳香族アミン生産大腸菌の創生と発酵生産の効率化
Bioproduction of new aromatic amine analogs in *Escherichia coli*
○川﨑 志慧、桝尾 俊介、皆川 一、高谷 直樹（筑波大生命環境）
○Yukie Kawasaki, Shunsuke Masuo, Hajime Minakawa, Naoki Takaya (Fac. Life Env. Sci., Univ. Tsukuba)

**【目的】**芳香族アミンは高性能イミダゾール系バイオプラスチックの原料として期待される化合物である。我々はこれまでに代謝工学的改変手法によりグルコース由来の 4-アミノフェニルエタノール(4APE)、4-アミノフェニルピルビン酸(4APAA)、4-アミノフェネチルアミン(4APEA)を生産する大腸菌を創出してきた [1)]。本研究ではアミン系芳香族原料として最も期待される 4 APAA の生産に向けた大腸菌の発酵条件の最適化と、4APAA の類縁体である 4-アミノジヒドロ桂皮酸(4AHCA)の新規生産系の構築を目的とした。**【方法・結果】**4APAA 生産大腸菌 NDPGAA 株(NST37 *ΔpheLA* pET-*pfpapA*, pCDF-*pfpapBC*, pACYC-*aroG4* and pRSF-*aro10ald2*)のフラスコ培養条件(温度・培地組成・IPTG 誘導等)を最適化することで 0.6 g $L^{-1}$ の 4APAA をグルコースから発酵生産することができた。次に、4-アミノ桂皮酸(4ACA)のエノン部位の還元により新規類縁体である 4AHCA の生産を目指した。*Clostridium acetobutylicum* 由来の 2-enoate reductase (*ca2enr*)を pRSFDuet-1 に連結し大腸菌に導入した。得られた菌株(*E. coli* BL21 pRSF-*ca2enr*)を用いて生物変換を行ったところ、pH 7.0 の嫌気条件下で 4ACA から 4AHCA への還元が観測された(変換効率>95% mol $mol^{-1}$)。これを用いて、グルコースを原料として生産した 4ACA を 4AHCA に変換可能であったことから、バイオマス由来 4AHCA の生産が可能となったと考えられた。




1) Masuo S., *et al.,* Sci. Rep., 6, 25764. doi:10.1038/srep25764 (2016).

aromatic amines, enoate reductase, bacterial production

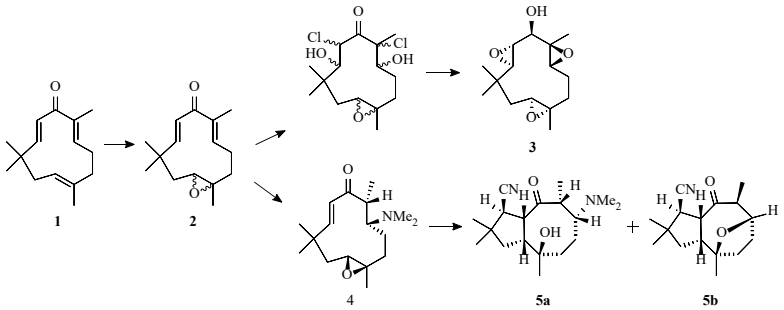
講演番号：2C26p15
講演日時：3 月 18 日 17:50～ C 校舎 26 会場

# リパーゼ触媒を用いた酸化型光学活性 zerumbone の立体選択的合成

# Stereoselective synthesis of optically active zerumbone oxide using lipase-catalyzed transesterification

○川村 彩夏、宇高 芳美、北山 隆（近畿大院・農・バイオ）
○Ayaka KAWAMURA, Yoshimi UTAKA, Takashi KITAYAMA (Major. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agric.)

【緒言】ゼルンボン **1** は、東南アジアで多く栽培されているハナショウガ(*Zingiber zerumbet Smith*)の根茎部が、乾燥重量当たり 3~4%含有する 11 員環のフムレン型セスキテルペンである。環内に共役二重結合、共役カルボニル基、孤立二重結合を有し、これら官能基の組み合わせによって多様な反応性を示すことを当研究室で明らかにしている [1]。その中でゼルンボンのオレフィンは容易に酸化されることによって様々な立体を有するエポキシ体の合成が可能となるだけでなく、エポキシ基は種々の求核剤のアクセプターとなるため、ゼルンボンのエポキシ体は有用物質の合成中間体として利用が期待できる。これまでに 6,7-エポキシゼルンボン **2** に次亜塩素酸ナトリウムを作用後、$NaBH_4$ で処理することによってジアステレオ選択的にゼルンボントリエポキシ体 **3** が得られ、立体選択的多酸化体の構築が可能となり、さらにこの化合物の光学活性体の合成にも成功している [2]。また、3-ジメチルアミノ-6,7-エポキシゼルンボン **4** にシアノ基を作用させると、11 位から位置選択的渡環反応によってエポキシドが開裂し、天然物に存在するアステリスカン骨格 **5a**, **5b** が構築できる [3]。このようにゼルンボンへのエポキシ基の導入は天然物の利用法を拡大する上で重要な役割を果たす。そこでゼルンボンの 3 つのオレフィンを利用するとさらに多様な立体化学を有するエポキシ体が得られるため、本研究では電子配向性を利用した機能性物質の開発を目指し、すべてのエポキシ基が環平面に対して同一の立体化学をもつ all-*erythro* 光学活性ゼルンボントリエポキシドを合成した。




【結果】ゼルンボンを *m*CPBA 酸化し、続いて LAH 還元することで得られる 6, 7–エポキシゼルンボールの Sharpless 酸化により、all-*erythro* のトリエポキシゼルンボールが得られたが、興味深いことに得られたトリエポキシゼルンボールは、ラセミ体であった。そこで、Lipase 触媒を用いた速度論的トランスエステル化を行ったところ、立体選択的に光学活性体を得ることに成功した。

1. Kitayama, T. et al. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2667–2672.
2. Kitayama, T. et al. *Tetrahedron; Asymmetry,* **2007**, *18*, 1676–1681.
3. Kitayama, T. et al. *Tetrahedron.* **2003**, *59*, 4857–4866.

zerumbone, Lipase, Optically active

発表責任者：北山　隆（kitayama@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：2C26p16
講演日時：3 月 18 日 18:05～ C 校舎 26 会場

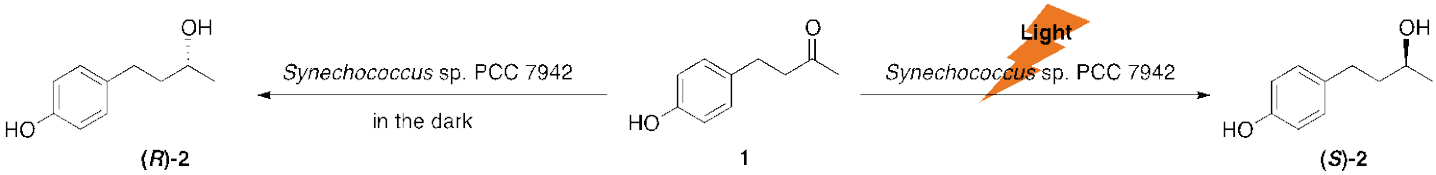
# 藍藻によるラズベリーケトンの不斉還元

# Asymmetric reduction of raspberry ketone by cyanobacteria

○山中 理央[1]、小西 徹[2]、村上 まり[2]、北山 隆[2] ([1]姫路獨協大薬、[2]近畿大農・バイオ)
○Rio Yamanaka[1], Tohru Konishi[2], Mari Murakami[2], Takashi Kitayama[2] ([1]Dept. Pharmaceutical Science, Himeji Dokkyo Univ., [2]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agric. Kindai Univ.)

【目的】ラズベリーから得られるラズベリーケトン **1** は、ベンジルアセトンを母骨格とした単純な構造で、興味深い種々の生理活性を示し、医薬開発の重要なリード化合物として期待される。その還元体であるラズベリーアルコール **2** には光学活性体が存在し、メラニン生成抑制効果、肝機能向上効果などの生理活性を示す。一般的に光学活性体はそれぞれまったく異なる生理活性を示すことが多く、リード化合物として利用するためには、**2** の純粋な光学活性体をつくり分ける必要がある。本研究では、立体選択的還元が行われた報告のある微細藻類の一種である藍藻 (*Synechococcus* PCC7942) を生体触媒として利用し [1]、**2** の光学活性体を効率的に作り分けることを目的とした。藍藻などの光合成生物は二酸化炭素を炭素源とするため、空気中の炭酸ガスや無機塩のみで持続的培養が可能である。そのため、微細藻類は二酸化炭素を削減しつつ、有用物質を生産することが可能な非常にエコロジカルな生体触媒として有望である。また、 *Synechococcus* PCC7942 を生体触媒とした還元反応では、光照射下で反応させた場合、光エネルギーを利用した補酵素(NADPH)の再生が行われており、エネルギー源として光のみを利用するという面でも効率の良い反応である [2]。

【方法と結果】藍藻を一定の温度、かつ弱光下で培養し、各培養段階から取り出した藍藻を用いて、1 を様々な藍藻量、光条件で反応させた。その結果、明条件の場合、*S* 体の 2 を高エナンチオ選択的に得ることができた。また、興味深いことに、暗条件で反応を行った場合、立体選択性が変わり、*R* 体の 2 を選択的に得られることが分かった。最終的には 2 を変換率 100%、かつ *S* 体を 99% ee 以上の不斉収率で得ること、そして *S* 体、*R* 体を作り分けることを目的として、反応時の条件検討を行っている。




**References**

1) Nakamura K.; Yamanaka R. *Tetrahedron Letters* **2000**, *41,* 6799-6802.
2) Yamanaka R.; Nakamura K.; Murakami A. *AMB Express* **2011**, 1:24.

Photobiocatalysis, Asymmetric reduction, cyanobacteria

発表責任者：山中理央（rioy@himeji-du.ac.jp）

講演番号：2J27a01
講演日時：3 月 18 日 09:20～ J 校舎 27 会場

# 組み換えラッカーゼによる PCB 分解の検討

# PCB degradation by using recombinant laccase.

○泉 咲綾[1]、青澤 理恵[1]、家藤 治幸[1]、原 富次郎[2]、高塚 由美子[3]、渡辺 誠也[1,4] ([1]愛媛大農、[2]京都府立医科大院、[3]京都高度技術研究所、[4]愛媛大 CMES)
○Saya IZUMI[1], Rie AOSAWA[1], Haruyuki IEFUJI[1], Tomijiro HARA[2], Yumiko TAKATSUKA[3], Seiya WATANABE[1,4] ([1]Ehime Univ., [2]Grand. Sch. Med. Sci. Kyoto univ med., [3]ASTEM, [4]Ehime Univ. CMES)

【背景・目的】ラッカーゼは酸素存在下で幅広い基質を酸化する酵素で、植物・菌類・細菌などの幅広い生物に見られる。産業的には、木材繊維の脱リグニン化・植物多糖の酸化・環境汚染物質の除去、など様々な分野で応用されている。ポリ塩化ビフェニル（polychlorinated biphenyl; PCB）は、代表的な有機塩素系の環境汚染物質の 1 つであり、理論的に置換塩素の位置や数が異なる 209 種類の同位体が存在する。本研究では、バイオレメディエーションによる PCB 分解能力の検討を行った。

【方法】ラッカーゼ生産生物から直接酵素を得る場合、長期間の培養が必要なだけでなく発現量も十分ではない。組換えタンパク質として発現させる場合は、不溶性タンパク質として生産されたり、宿主細胞の機能に損傷を与えるなどの要因により困難である。これに替わり我々は以前、酵母 *Cryptococcus* sp. S-2 株を宿主とし、キノコの 1 種である *Trametes versicolor* 由来のラッカーゼ 5（TvLAC5）と植物病原菌 *Gaeumannomyces graminis* 由来のラッカーゼ 2（GgLAC2）の効率的な細胞外分泌発現系を構築した。組み換え *Cryptococcus* sp. S-2 の培養上清を凍結乾燥したものを酵素として以下の実験に供した。

【結果】まず、最適 pH と最適温度を調べるために、基質として 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid)（ABTS）を用いてラッカーゼ活性を測定した。活性測定の結果、TvLAC5 と GgLAC2 の最適 pH は 3.0・4.0、最適温度は 50℃・40℃だった。その後、染料 Remazol Brilliant Blue R （RBBR）、Methly red、Bromophenol blue、Coomassie Brilliant Blue （CBB）を用いて染料の分解実験を行った。その結果、TvLAC5 では RBBR・Methly red・Bromophenol blue・CBB が、GgLAC2 では Methly red・Bromophenol blue・CBB の分解がみられた。

【考察】組み換え酵素の発現量は、GgLAC2 のほうが TvLAC5 よりも高い。一方、RBBR や red poly（vinylamine）sulfonate-anthrapyridone（Poly R-478）を脱色できるラッカーゼは、効率的な PCB 分解が可能であることが知られているので、この点では GgLAC2 よりも有望である。現在、PCB 分解実験を行っているので、その結果も報告する。

laccase, PCB, bioremediation

講演番号：2J27a02
講演日時：3 月 18 日 09:35～ J 校舎 27 会場

# 変異型ビフェニルジオキシゲナーゼを用いた PCB 分解特性改変の検討

# Site-directed mutagenetic study of biphenyl dioxygenase for bioremediation of PCB.

○青澤 理恵[1]、泉 咲綾[1]、原 富次郎[2]、高塚 由美子[3]、渡辺 誠也[1,4] ([1]愛媛大農、[2]京都府立医科大院、[3]京都高度技術研、[4]愛媛大 CMES)
○Rie AOSAWA[1], Saya IZUMI[1], Tomijirou HARA[2], Yumiko TAKATSUKA[3], Seiya WATANABE[1,4] ([1]Ehime Univ., [2]Grad. Sch. Med. Sci. Kyoto Univ Med., [3]ASTEM, [4]Ehime Univ. CMES)

【研究の背景】ポリ塩化ビフェニル（Polychlorinated biphenyl; PCB）は、有名な有機塩素系の環境汚染物質の 1 つであり、置換塩素の数や位置の違いで理論上 209 種類の異性体が存在する。微生物の代謝機能を利用したバイオレメディエーションを目指して、多くの PCB 分解株が単離されてきた。特に好気性細菌では、ビフェニル資化に働く一連の代謝酵素群によって分解が進行する。

ビフェニル資化経路の中で、初発段階であるビフェニルジオキシゲナーゼ（BDO）による水酸基の導入が、PCB 分解で最も重要である。BDO は多成分酵素であり、大サブユニット（BphA1）と小サブユニット（BphA2）の 2 種類で構成される末端ジオキシゲナーゼに加え、フェレドキシン（BphA3）とフェレドキシン還元酵素（BphA4）を含む電子伝達系から成っている。この中で、BphA1 への変異導入により PCB 分解特異性を改変することができるが、全ての異性体を効率的に分解できるものはいまだ創出できていない。

【研究の方法】BphA1 が属するリースケ型（非ヘム鉄）酸化酵素スーパーファミリーは、似た構造骨格を持つ化合物を基質とするサブファミリーからなっている。BphA サブファミリーの枝を系統樹の根に向かってたどって行くと、好熱性細菌 *Thermocrispum municipale* 由来の機能未知タンパク質があるのを見出した。好熱性生物のタンパク質は、祖先型の広い基質特異性を受け継いでいるという仮説に基づいて、そのアミノ酸配列を参考に BphA1 変異体のデザインを行った。

【研究の結果】PCB 分解菌として知られる *Burkholderia xenovorans* LB400 株由来の BphA 遺伝子（$BphA_{LB400}$）を pET-15b プラスミドに導入した大腸菌での組み換えタンパク質発現系を用いた(1,2)。ビフェニル結合部位周辺で LB400 株と *T. municipale* で異なるアミノ酸残基を選抜し、Q322A、T335G、I341V、およびその組み合わせ等の $BphA_{LB400}$ 変異体を作製した。ビフェニル分解活性に及ぼす影響を調べたのち、カネクロール KC-300 による PCB 分解実験を行った。

1、西山亜紀，高塚由美子，片倉苑香，大場好弘，原富次郎．ビフェニルジオキシゲナーゼサブタイプ複合型の細菌触媒によるポリ塩化ビフェニル類の分解．日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014 年 3 月 28 日～30 日, 東京
2、Hara, T., and Y. Takatsuka. Enzymatic composition of two different types of bacterial catalyst efficiently degrade polychlorinated biphenyls. ASM2015 115th General meeting, American Society for Microbiology. 2015 年 5 月 30 日～6 月 2 日, New Orleans, Louisiana (USA)

Rieske-type oxygenase, Bioremediation, *Burkholderia xenovorans* LB400

講演番号：2J27a03
講演日時：3 月 18 日 09:50～ J 校舎 27 会場

Biodegradation of phenolic compounds by *Bacillus licheniformis* strain TAB7

○ Enock Mpofu[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1], Felipe VEJARANO[1], Joydeep CHAKRABORTY[1], Toshiaki KIMURA[2], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Toyota Biotech. & Afforestation Lab., Toyota Motor Corp.)

**[Background]** *Bacillus licheniformis* TAB7[1)] is a facultative anaerobic thermophile originally isolated as a Tween 20 degrader from manure compost. It was subsequently shown to degrade short chain fatty acids responsible for the offensive odor in manure. There are reports that compost deodorized using strain TAB7 resulted in better germination and growth of komatsuna vegetables compared to undeodorized compost leading to interest in the ability of TAB7 to degrade some plant germination and growth inhibitors in compost. A number of phenolic compounds are found in considerable amounts in manure and have been shown to have negative allelopathy on germination and growth of some plants. Thus we sought to determine the ability of TAB7 to degrade various phenolic compounds and unravel the degradation pathway(s) involved therein. To this end, we have already confirmed the degradation of 4 different phenolic acids which we present herein, viz. ferulic acid, vanillic acid, protocatechuic acid and syringic acid.

**[Method]** *Bacillus licheniformis* TAB7 was grown in LB media individually with 0.2 mg/mL of each phenolic acid and incubated at 30˚C under shaking conditions. Samples were taken at intervals, acidified and extracted with ethyl acetate. Ethyl acetate was evaporated and the analyte was re-dissolved in methanol and analyzed by HPLC with Diode-Array Detector (DAD).

**[Results**] TAB7 could degrade ferulic and vanillic acids to undetectable levels within 6 hours of incubation while it took 7 days for protocatechuic acid to be degraded to near undetectable levels. Syringic acid was slightly degraded even after 15 days of incubation. A local BLAST search against TAB7 draft genome revealed a putative phenolic acid decarboxylase (*padC*) gene whose translated protein sequence showed 84.4 % identity with PadC (GenBank: AAC46254). Ferulic, *p*-coumaric and caffeic acids are known substrates of PadC. Local BLAST search for a vanillic acid decarboxylase homolog yielded a putative gene with 62.5% identity with a vanillic acid decarboxylase (VdcC) (GenBank: AAD28782) and could be responsible for the decarboxylation of vanillic acid. Protocatechuic acid could be degraded via 2,3 (*para*) cleavage pathway of protocatechuic acid as local BLAST search showed the presence of a protocatechuate 2,3-dioxygenase homolog with 52.5% identity to protocatechuate 2,3-dioxygenase, PraA (GenBank: BAH79099). Further elucidation of the metabolic pathways based on both identification of intermediate metabolites as well as genome analysis is underway.

1) T. Kimura *et al*., ORBIT (Organic Resources and Biological Treatment) Conference (2014)

biodegradation, *Bacillus licheniformis*, phenolic compounds

発表責任者：Nojiri Hideaki（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2J27a04
講演日時：3 月 18 日 10:05～ J 校舎 27 会場

スルファニル酸分解菌の単離及び特性
Isolation and characterization of sulfnilic acid-degrading bacteria
○近藤 美咲、牛尾 一利、中川 克彦、早瀬 伸樹（新居浜高専　生物応化）
○Misaki KONDO, Kazutoshi Ushio, Katsuhiko Nakagawa, Nobuki Hayase (Niihama College)

【目的】合成染料の約半分を占めるアゾ染料の脱色により生じる芳香族アミン化合物は、染料と同じく難分解性で、環境や人体に悪影響を及ぼす原因の一つであり、環境保全のためにも芳香族アミン化合物をさらに分解し、無毒化する必要がある。本研究では、アゾ染料のオレンジ II 等が分解することによって生じる芳香族アミン化合物であるスルファニル酸を分解する微生物の単離及びその特性について検討を行った。
【方法と結果】スルファニル酸分解菌を分離するために、スルファニル酸を単一炭素源とした培地を用いて 30℃で集積培養を行った。濁りの認められた集積培養液をスルファニル酸寒天培地に植菌したが、スルファニル酸分解菌の安定した増殖は認められなかった。そこで、段階希釈した集積培養液をスルファニル酸液体培地へ植菌して 30℃で培養し、希釈法により単離を行った。その後、希釈法により得られた培養液を L 寒天培地、スルファニル酸寒天培地に植菌して培養したところ、L 寒天培地及びスルファニル酸寒天培地より各 1 株の微生物が分離された。L 寒天培地より分離した 624-L 株をスルファニル酸寒天培地、スルファニル酸寒天培地より分離した 624-S 株を L 寒天培地に植菌して培養したところ、624-L 株はスルファニル酸寒天培地では増殖しなかったが、624-S 株は L 寒天培地上で小さなコロニーを形成した。これらの微生物は、16S-rRNA の解析結果より、624-L 株は *Diaphorobacter sp.*、624-S 株は *Bradyrhizobiaceae* 科であると考えられた。次に、スルファニル酸液体培地へ 624-L 株、624-S 株をそれぞれ別々に、また両菌株を混合して植菌し、30℃で振とう培養した。その結果、624-L 株の単独培養では増殖は観察されず、スルファニル酸はほとんど分解されなかったが、624-S 株の単独培養においては増殖が観察され、スルファニル酸も約 60%分解された。一方、両菌株の混合培養では、菌体の顕著な増殖が観察され、スルファニル酸はほぼ完全に分解された。以上の結果から、集積培養液におけるスルファニル酸分解は、624-L 株、624-S 株の両株によって行われており、624-S 株がスルファニル酸を分解する能力、624-L 株は 624-S 株に対する増殖促進効果を有していると考えられる。現在、両株の共生関係について検討を行っている。

sulfnilic acid-degrading bacteria, azo dye

講演番号：2J27a05
講演日時：3 月 18 日 10:20～ J 校舎 27 会場

# シャペロニン GroES/EL による CarBaBb 酵素複合体の会合様式の解明

# Contribution of the GroES/EL chaperonin system to the assembly of the CarBaBb enzyme complex

○山本 寛樹、岩田 健一（芝工大院シ）
○HIROKI YAMAMOTO, KENICHI IWATA (Shibaura Institute of Technology)

【目的】

*Pseudomonas resinovorans* CA10 株の carbazole (CAR)分解経路に関わるメタ開裂酵素 CarBaBb は、活性部位の CarBb と安定化に関わる CarBa の 2 subunits から構成されるヘテロ酵素複合体である。しかしながら、2 subunits の形成による酵素複合体の安定条件の詳細情報は、未だ不明である。そこで、本研究では、会合に関与する 2 subunits 間の接触界面に着目し、chaperonin (GroES/EL)による接触界面の正確な folding が酵素複合体の安定化に寄与すると推測した。そして、in vitro にて GroES/EL による酵素複合体形成の関与を明らかにし、最適な安定条件を見出すことを目的とした。

【方法】

CA10 株由来の *carBa* 及び *carBb* の遺伝子を挿入した *pUCarBa-h* 及び *pUCarBb-h* の plasmid を構築し、各々C 末端に His-tag が付加するように設計した。また、*Escherichia coli* BL21 株由来の GroES/EL は、CarBaBb 間の接触界面の形成に関与すると推測されるため、*pUCGroES-h* 及び *pUCGroEL-h* の plasmid を各々設計した。そして、各発現系の目的タンパク質を抽出し、His-tag を利用した metal-chelate affinity chromatography (MCAC)を行った。さらに、夾雑のタンパク質を除去するために gel filtration chromatography (GFC)による精製を行う。その後、SDS-PAGE により、CarBa, CarBb 及び GroES, GroEL が精製されていることを確認する。そして、in vitro の条件下にて、ATP を添加した GroES/EL を含む CarBa/Bb の混合液の至適濃度を検討する。酵素複合体の形成は、基質として 2,3-dihydroxybiphenyl (2,3-DHBP)を用い酵素活性を測定することにより、CarBa/Bb が会合し酵素複合体が形成されていることを明らかにする。

【結果】

アガロースゲル電気泳動結果から、*pUCarBa-h* 及び *pUCarBb-h*、*pUCGroES-h* 及び *pUCGroEL-h* に目的の遺伝子が各々挿入されていることが確認できた。また、MCAC による精製結果は、*pUCarBa-h* 及び *pUCarBb-h*、*pUCGroES-h* 及び *pUCGroEL-h* ともに良好な peak が得られた。その後、各群の peak 間を回収し、CarBa 及び CarBb, GroES 及び GroEL が精製されていることを SDS-PAGE により確認した。今後は、夾雑タンパク質を除去するため、GFC を行う予定である。また、良好な精製が確認できた後は、ATP の濃度の検討や GroES/EL が機能する至適条件を見出す予定である。そして、GroES/EL による CarBaBb の複合体形成の安定な条件を明らかにする。

GroES/EL, CarBaBb, enzyme complex

発表責任者：山本　寛樹（mf15079@shibaura-it.ac.jp）

講演番号：2J27a06
講演日時：3 月 18 日 10:45～ J 校舎 27 会場

# Diversity of carbazole degradative gene clusters, mobilization and recruitment according to whole genome sequencing

○ Felipe VEJARANO[1], Joydeep CHAKRABORTY[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1], Yu KANESAKI[2], Hirofumi YOSHIKAWA[2], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Tokyo Univ. of Agriculture)

**[Background]** Carbazole, a heterocyclic aromatic compound with mutagenic and carcinogenic potential, is released to the environment as a result of the commercial exploitation of fossil fuel and its derived products. In several carbazole-degrading bacteria, studies on the genetic system of the degradation pathway have shown the diversity of the components that comprise the initial Rieske-type oxygenase, the variety in the order and location of the carbazole degradative (*car*) gene clusters and their distribution among various bacterial clades. In order to understand the role of insertion sequences (IS) and other mobile genetic elements (MGE) in the mobilization and recruitment of the different types of *car* gene clusters, we aim to complete the genome assemblies of representative carbazole degraders by hybrid sequencing using Illumina's PCR-free and mate-pair genomic libraries with PacBio RS II sequencing data.
**[Methods]** We have previously presented the draft genome sequences of 32 carbazole degrading bacteria from activated sludge (8), soil (7), marine water (16) and fresh water (1), assembled from the short reads obtained using MiSeq, HiSeq and GS FLX Titanium sequencers. Nine among them were selected as representatives of the different types of *car* gene clusters. In this study, their genomes were re-sequenced using Illumina's PCR-free libraries and mate-pair libraries are being prepared to fill the gaps between contigs. Furthermore, three [*Hyphomonas* sp. KY3 (sea), *Thalassococcus* sp. S3 (sea) and *Nocardioides aromaticivorans* IC177 (soil)] of the representative strains are being sequenced using the PacBio RS II sequencer.
**[Results and Discussion]** Resequencing PCR-free libraries yielded an improvement over the quality of previous draft data as evidenced by a decrease in the number of assembled contigs for all the representative strains. Bioinformatics analyses identified remnants of IS families IS*6*, IS*3*/IS*5* and IS*3* in the marine bacteria *Hyphomonas* sp. KY3, *Erythrobacter* sp. KY5 and *Nocardioides* sp. S5, respectively, possibly involved in the recruitment of *car* genes. In the soil bacterium, *N. aromaticivorans* IC177, IS families IS*21*/IS*110* seemed responsible for their chromosomal integration, illustrating the diversity of recruitment events even in members of the same clade that reflects differences in environmental selection pressures. Previously identified candidate genes for unreported components of the initial dioxygenase and a CoA-ligase for an alternative anthranilate degradation route in marine isolates will be inspected at the transcription level to determine the involvement of such candidate genes in carbazole degradation. For this, RNA sequencing experiments are underway.

biodegradation, carbazole, insertion sequence

発表責任者：NOJIRI Hideaki（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2J27a07
講演日時：3 月 18 日 11:00～ J 校舎 27 会場

*Rhodococcus erythropolis* PR4 株を用いた微生物細胞入り有機溶媒ミセル液の炭化水素の分解への有用性

Effects of the micelle solution containing *Rhodococcus erythropolis* PR4 cells on the biodegradation of oils

○田上 晃二、牧 紘平、岩淵 範之、砂入 道夫（日大・生資科・応生科）
○Koji Tanoue, Kohei Maki, Noriyuki Iwabuchi, Michio Sunairi (Dept. Appl. Bio. Sci., Nihon Univ.)

【目的】

*Rhodococcus erythropolis* PR4 株は、難揮発性有機溶媒に優れた耐性を有し、かつ、細胞がアルカン中に移行して生育できる炭化水素分解菌である。これまでの研究で、本菌は、液体培地と有機溶媒からなる培地/アルカン二相培養系で培養した場合、添加する有機溶媒の炭素数により相互作用が異なることが知られている。すなわち、炭素数9 (C9)以下のアルカンを添加した場合、菌の生育がほとんど見られず、C10~C12 のアルカンでは、水／アルカンの界面に菌体が水相側に位置した状態で吸着し、C13 以上のアルカンを添加した場合では、細胞がアルカン相内へ移行し、増殖することが示されている。それ故、PR4株が有するアルカン中で生育できるという性質は、bioavailabilityの低さが問題となり、その処理が難航している高疎水性の有機化合物の分解、浄化に有用であると考えられ、微生物製剤への応用が期待されている。

一方で、超音波による水／有機溶媒の二相液の乳化は、乳化剤を使わないことから、環境負荷の少ない乳化技術として期待されている。それ故、我々は、PR4株が有機相に存在する二相液を超音波処理することで、細胞入りのミセル液が出来るのではないか？と考えた。本研究では、将来的な微生物製剤の開発を念頭に置いて、PR4株がアルカン相に移行した二相培養液を超音波処理によりミセル化液を作製し、その石油分解への有効性を検討した。

【方法、結果と考察】

IB2 液体培地に各種アルカンを添加した二相培養系で PR4 株を培養し、細胞をアルカン相に移行させた。この培養液を超音波処理器により乳化処理を行い、ミセル粒径、平均細胞数、細胞の生理状態、weathered crude oil (W-oil)の分解性を検討した。その結果、IB2 培地にヘキサデカン(C16)を 10%(v/v)で添加した条件において、平均粒径が 12.5 μm の C16 中に平均細胞数が 4.2 cells/particle で存在する含微生物ミセル液を作製した。CTC 染色により、これらの細胞の呼吸活性を検討したところ、超音波処理により呼吸活性は失われないことが示された。また、その生菌数を検討したところ、超音波処理の前後で結果が変わらなかったことから、超音波処理は、PR4 株の生育に影響を及ぼさないと考えられた。続いて、サンプルの W-oil の分解性を検討したところ、ミセル化された菌体を投入した条件は、他の条件に比べ、序盤の分解率が高かった。以上のことから、超音波処理により得られた含微生物細胞アルカンミセル液は、微生物製剤の製造法として有用である可能性が示された(特願 2016-97159)。

micelle solution, biodegradation, *Rhodococcus erythropolis* PR4

発表責任者：岩淵範之（iwabuchi.noriyuki@nihon-u.ac.jp）

講演番号：2J27a08
講演日時：3 月 18 日 11:15～ J 校舎 27 会場

*Rhodococcus erythropolis* PR4 のアルカンとの相互作用に対する $MgSO_4$ の影響
Effects of $MgSO_4$ on the interactions between bacterial cells and alkane in *Rhodococcus erythropolis* PR4

○田淵 大樹[1]、瀧原 速仁[2]、岩淵 範之[1]、砂入 道夫[1] ([1]日大・生資科・応生科、[2]新潟大院・医)
○Daiki Tabuchi[1], Hayato Takihara[2], Noriyuki Iwabuchi[1], Michio Sunairi[1] ([1]Dept. Appl. Bio. Sci., Nihon Univ., [2]Niigata Univ.)

【目的】

*R. erythropolis* PR4 株は、細胞とアルカンとの相互作用が極めて特徴的であることが明らかにされている。すなわち、培地/アルカン二相培養系において、添加するアルカンの炭素数によって、水/アルカンの界面に菌体が水相側に位置した状態で吸着する「吸着型」、あるいは水相に接種した細胞がアルカン相内に転移して生育する「転移型」というように、同菌が炭素数により細胞の局在性を変化させる極めて特徴的な挙動を示す株であること示されている。また、後続の研究で PR4 株は、無機塩培地(NP 培地)に *n*-ドデカン(C12)を重層した NP+C12 培地の二相培養系において、$MgSO_4$ の添加量、添加時期などを調節するにことよって、上述した細胞の局在性を意図的に制御(吸着型から転移型へ、あるいはその逆など)できることが示唆されている。

本現象は、PR4 株を利用する上で非常に重要な要素であるが、なぜ $MgSO_4$ がこのような現象を引き起こすのか？は未だ不明である。本研究では、$MgSO_4$ による細胞の局在性を変化させる機構を解明することを目的として、各種解析を行った。

【方法および結果と考察】

まず初めに、*R. erythropolis* PR4 株を NP+C12 培地 (0.5 g/L の $(NH_4)_2SO_4$、0.5 g/L の $K_2HPO_4$、5% (v/v) の C12)に接種し、$MgSO_4$ の添加の有無や添加時期を変化させて、培養し、その局在性を経時的に検討した。その結果、$MgSO_4$ 添加条件では、培養初期の段階から実験終了時まで一貫して吸着型を示し、一方で細胞 $MgSO_4$ 添加条件では転移型を示していた。次に、同条件でのコロニー数の推移を検討したところ、$MgSO_4$ 添加条件に比べ、無添加条件の方が約 10 倍高かった。これは、PR4 株は転移型の方が良好な生育を示すというこれまでの傾向と一致した。続いて、培養の途中で $MgSO_4$ 添加した場合の影響を検討した。その結果、$MgSO_4$ を添加した 48 時間後から細胞の局在性が吸着型に変化し、その後培養終了時までその状態を示した。また、同時にコロニー数が低下し始め、最終的には無添加条件と比べ、約 1/100 に低下した。これらの結果は、$MgSO_4$ の添加が NP+C12 培地での生存を抑制しているように見受けられた。

これらの結果を確認するため、各条件による CTC 染色を行ったところ、$MgSO_4$ 添加条件では、吸着型を示す細胞において高い呼吸活性が確認された。一方で、$MgSO_4$ 無添加条件では、高い呼吸活性は確認できなかった。本現象は非常に興味深く、現在、その詳細を確認している。

*R. erythropolis* PR4, $MgSO_4$, alkane

発表責任者：岩淵　範之（iwabuchi.noriyuki@nihon-u.ac.jp）

講演番号：2J27a09
講演日時：3 月 18 日 11:30～ J 校舎 27 会場

Gene expression analysis of aerobic and anaerobic benzene degradative genes of *Azoarcus* sp. DN11

○ Allan DEVANADERA[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1], Yuki KASAI[2], Yoh TAKAHATA[3], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Chuo Univ., [3]Taisei Corp.)

**[Introduction]** Benzene is a soil and groundwater pollutant, which causes health concern because of its carcinogenicity. Oxygen-dependent pathways for microbial benzene metabolism have been studied extensively. In contrast, hydrocarbon-contaminated subsurface sites usually become anoxic which renders the study on anaerobic benzene degradation highly important. *Azoarcus* sp. DN11, a denitrifying bacterium, has been shown to be capable of degrading benzene, toluene, benzoate, but not phenol, under both aerobic and anaerobic conditions (Kasai *et al.*, 2007*, Environ. Sci. Technol.*, 41, 6222-6227). However, its metabolic pathways for aerobic and anaerobic benzene degradation have not yet been clarified. Three initiating pathways have been proposed for anaerobic benzene ring activation: methylation to toluene, hydroxylation to phenol and carboxylation to benzoate. Aerobic benzene degraders use monooxygenase or dioxygenase to initially hydroxylate the benzene ring to form catechol which will be metabolized through TCA cycle. This study aims to identify genes involved in the aerobic and anaerobic benzene degradation of *Azoarcus* sp. DN11. **[Methods]** Reverse transcription-PCR was performed to analyze the expression of putative aerobic and anaerobic genes identified through BLAST searching within the draft genome of *Azoarcus* sp. DN11. Cells were grown on benzene as sole carbon source to induce the expression of the genes responsible for benzene degradation. Media preparations and laboratory manipulations were conducted under strict anoxic conditions for anaerobic experiments. Cells were harvested for RNA extraction during active benzene degradation. The synthesized cDNA was amplified using gene-specific primers to target the identified putative benzene genes. **[Results]** For anaerobic benzene gene analysis, the expression of gene_73 and gene_211, which code for enzymes that catalyze the initial anaerobic benzoate and toluene metabolism, respectively, were observed by RT-PCR. The gene_33 which codes for the initial anaerobic phenol metabolism was not expressed under anaerobic condition. These results suggest that DN11 does not follow the phenol pathway in degrading benzene anaerobically. For the analysis of aerobic benzene genes, the expression of gene_199 and gene_178 which codes for monooxygenase and dioxygenase, respectively, was compared in cells grown on benzene and succinate. Both genes were expressed in cells grown on benzene. However, only gene_178 was expressed in cells grown on succinate. This suggests that DN11 both uses monooxygenase and dioxygenase to metabolized benzene aerobically. Moreover, gene_119 is an inducible gene that is only expressed when cells are exposed to benzene.

biodegradation, benzene, *Azoarcus*

発表責任者：NOJIRI Hideaki（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2J27a10
講演日時：3 月 18 日 11:45～ J 校舎 27 会場

# 微生物捕食による汚泥減容の試みと *de novo* メタトランスクリプトーム解析による分子基盤の解明

# Application of microbial predation to biomass reduction in activated sludge and its characterization by *de novo* metatranscriptome analysis

○佐藤 由也、堀 知行、ナバロ ロナルド、長縄 竜一、尾形 敦、羽部 浩（産総研・環境管理）
○Yuya SATO, Tomoyuki HORI, Ronald R NAVARRO, Ryuichi NAGANAWA, Atsushi OGATA, Hiroshi HABE (AIST, EMRI)

【背景・目的】活性汚泥法は 100 年以上世界中で水処理に利用されてきた、最も身近で重要なバイオテクノロジーである。しかし活性汚泥は数万種の複雑な微生物群で構成されるため、その制御は今なお困難であり、同法の処理効率向上を目指した技術開発が続いている。特に、系内で増えすぎた微生物（余剰汚泥）の処理コストはランニングコストの半分以上を占めるため、その減容化技術の開発には大きな注目が集まっている。活性汚泥中では「有機物を細菌が利用し、細菌を原生動物が捕食する」という食物連鎖が一般的だが、我々は原生動物だけでなく捕食性の細菌群が活性汚泥に一定量含まれることを見出しており、本研究ではこれらの捕食作用を汚泥減容化に応用することを試みた。さらに、参照ゲノムを必要としない *de novo* メタトランスクリプトーム解析を用い、貧栄養条件における微生物の捕食メカニズムの解明に挑んだ。

【実験・結果】本研究では（ⅰ）微生物捕食による汚泥減容の効果を確認するためにパイロットスケールの膜分離活性汚泥リアクターを用いた試験を行い、（ⅱ）捕食メカニズムを解析するためにラボスケールの活性汚泥培養試験を行った。（ⅰ）の試験では、230 L のリアクターを用いて人工下水の処理を 54 日間続けたところ、活性汚泥濃度の過度な上昇（MLSS：16,900 mg/L）と処理効率の低下が観察された。そこで、流入廃水の有機物濃度を半減させ系内を貧栄養条件とすることで、微生物捕食の促進を試みた。結果的に活性汚泥濃度は約 70%減少し、有機物濃度の制御によって活性汚泥の減容化が可能であることが示された。

（ⅱ）の試験では、人工下水添加有 / 無の 2 条件で活性汚泥を 12 日間培養した。人工下水を添加すると活性汚泥濃度は増加したが、添加無しの条件では徐々に減少した。培養 1, 4, 6, 12 日目の活性汚泥サンプルから RNA を抽出し、*de novo* メタトランスクリプトーム解析を行った。初めに rRNA の発現量に着目したところ、人工下水添加系では全体に占める真核生物の割合が 15%から 6%に減少したが、添加無しの系では 14%から 37%に増加しており、貧栄養条件で原生動物が高活性であることが示唆された。次に mRNA に着目すると、貧栄養条件で捕食性細菌由来の加水分解酵素が高発現しており、微生物細胞を低分子に分解して利用する捕食機構が推察された。活性汚泥中の微生物捕食は、これまで主に顕微鏡観察などで評価されており定量的な情報に乏しい。本成果は原生動物と細菌の両者とも微生物捕食に直接的に関与することを示しており、活性汚泥における複雑な微生物間相互作用を紐解く重要な知見を提供するものである。

*de novo* transcriptome analysis, microbial predator, activated sludge

講演番号：2J27p01
講演日時：3 月 18 日 14:00～ J 校舎 27 会場

# 環境汚染物質ビフェニルから PHA への効率的変換のための基盤づくり

# Establishing a basis for the efficient PHA production from an environmental pollutant, biphenyl

○矢島 泰斗、前田 理久 (明治大学)
○Taito Yajima, Michihisa Maeda (Meiji Univ.)

*Alcaligenes denitrificans* A41 株は PCB/ビフェニル分解能を有し、環境汚染物質ビフェニルを単一炭素源として生分解性プラスチックであるポリヒドロキシアルカン酸(PHA)を生産できる。これまで、PHA 生産の最適条件について培養に関する様々なパラメーターを中心に検討してきた。今回は、将来的により効率の良い PHA 生産を行えることを目指し代謝フローを詳細に解析したので報告する。

A41 株はビフェニル単一炭素源下では、対数増殖期を終えるころに生菌数が低下する。ビフェニル分解の中間代謝物である安息香酸が蓄積することが原因の一つだと考えられてきた。A41 株は元来安息香酸単一炭素源として生育できる。また、ゲノム情報からも安息香酸分解に関わる経路が十分あることが示唆されている。炭素源としてビフェニルをより効率的に利用するために、代謝中間体量の挙動を詳細に解析するところから始めた。

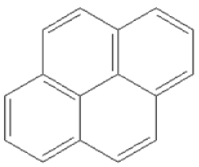
本実験では、培養液中のビフェニル残存量、中間代謝物(HOPDA, 安息香酸)の生成量などを定量した。その結果、A41 株におけるビフェニル消費は比較的安定した傾向を見せ、その特徴的なパターンから 2 期(フェーズ)に分けた。フェーズ 1 は対数増殖期に見られる増殖に並行した急速な消費(80 mg/h)で、フェーズ 2 は定常期に見られる緩やかな消費(14 mg/h)である。初期ビフェニル濃度が 0.5%(w/v)では、72 時間経過後約 90%消費された。一方で安息香酸生成量は培養 24 時間経過後までは安定していたが、それ以降は大きく変動した。いずれの場合も安息香酸生成量はビフェニルの消費量から推測される量に比べて小さく、理論値の半分以下であった。このことは安息香酸が分解されて何らかの代謝経路に入っていることを示唆している(ゲノム情報から予測される経路から推測されるものはアセチル CoA およびスクシニル CoA である)。安息香酸の生成量に見られた大きな変動に対して、ビフェニル消費はほとんど影響されなかった。これは、安息香酸生成量とビフェニル消費は直接的には関係しないことを示唆している。また、培養 24 時間経過以降の安息香酸存在量は大きく変動してはいるが、存在量が大きい状況下ではタンパク質量が低下した。このことは安息香酸には細胞毒性があることを示唆している。以上のことから、A41 株がビフェニルを効率的に炭素源として利用するためには、安息香酸分解遺伝子群の適切な活性化あるいは安息香酸を効率的に除去する微生物との共生が考えられる。今後は安息香酸分解経路に関連する代謝工学、適切な微生物との共培養を視野に検討を重ねていく予定である。

polyhydroxyalkanoate, biphenyl, benzoic acid

講演番号：2J27p02
講演日時：3 月 18 日 14:15～ J 校舎 27 会場

土壌・マングローブ底泥由来の微生物におけるピレン分解系の解析
Pyrene degradation systems in soil and mangrove sediment bacteria
○森田 知美[1]、ベハラノ フェリペ[2]、水口 千穂[2]、ワナパイサン パガクロン[3]、ラオタンティープ ナッタリガ[4]、ムアンチンダ チャノクポーン[4]、岡田 憲典[2]、ピンヤコン オルタイ[4]、岩田 健一[1]、野尻 秀昭[2] ([1]芝工大院シ、[2]東大生セ、[3]マヒドン大学、[4]チュラロンコーン大学)
○ Tomomi MORITA[1], Felipe VEJARANO[2], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[2], Pagakrong WANAPAISAN[3], Natthariga LAOTHAMTEEP[4], Chanokporn MUANGCHINDA[4], Kazunori OKADA[2], Onruthai PINYAKONG[4], Kenichi IWATA[1], Hideaki NOJIRI[2] ([1]Shibaura Institute of Technology, [2]The Univ. of Tokyo, [3]Mahidol Univ., [4]Chulalongkorn Univ.)

【背景】多環芳香族炭化水素（PAHs）の一種であるピレンは 4 つの芳香環が結合した構造（右図）を持ち、それ自身が汚染物質として環境中から検出されるほか、PAHs のバイオレメディエーションの手法を確立するためのモデル化合物としても使用されてきた。既知のピレン分解菌である *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 株ではピレン分解経路の詳細な解析が進んでおり、初発酸化酵素の terminal oxygenase をコードする遺伝子が *nidA* と *nidB*(それぞれ触媒, 構造保持サブユニットをコード) であることが明らかとなっている。昨年度の大会で、土壌から単離したピレン分解菌 9 株（TS3, CS21, CS22, ES3, KM31, KM32, KM34, OA32, OA36）が全て *Mycobacterium* 属細菌であったことを報告した。加えて、マングローブ底泥から単離された 5 株（*Bacillus* sp. FW1, *Mycobacterium* sp. PO1, *Mycobacterium* sp. PO2, *Novosphingobium* sp. PY1, *Ochrobactrum* sp. PW1）については、ピレン分解に直接関与しているのは PO1 株・PO2 株であり、残りは PO1 株・PO2 株と共存し全体として高いピレン分解活性を示すことが明らかとなった。分解遺伝子群はプラスミドに存在することが多いため、これら全 14 株についてプラスミドの有無を明らかにし、ピレン分解遺伝子群の局在を調べた。



【方法】上述の 14 株を対象にパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）を行った。菌株は LB 培地を用いて 30 °C で 4 日間振盪培養し、これを用いて懸濁液を作製し、plug 作製に用いた。菌株の溶菌条件は、グラム陽性菌では 1 mg/ml リゾチームと 0.8 mg/ml アクロモペプチダーゼを用いて 3 時間行い、グラム陰性菌では 1 mg/ml リゾチームを用いて 45 分間行った。PFGE は 0.5 x TBE を用いて 14 °C、電圧勾配 6 V/cm、スイッチ時間 5～60 秒、電場交差角度 120°、泳動時間 19 時間で行った。
【結果】PFGE により、KM31 株・KM32 株・KM34 株で約 120 kbp、TS3 株・PY1 株で約 150 kbp、PW1 株で約 140 kbp に相当する位置にそれぞれプラスミドと考えられるバンドが検出された。その他の菌株については染色体のバンドしか検出されず、プラスミドを保持しないことが示唆された。*Mycobacterium* 属細菌についてはピレン分解遺伝子群の局在を明らかにするため、*nid*A をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行い、ピレン分解遺伝子群の局在の解明を試みている。また全ゲノム解析から、FW1 株はバイオサーファクタント生成、PW1 株はプロトカテク酸分解、PY1 株はフタル酸分解に関与する遺伝子を保持することが明らかとなったため、PY1 株と PW1 株についてはこれらの遺伝子を対象にプローブを作製し、サザンハイブリダイゼーションを行う予定である。

biodegradation, polycyclic aromatic hydrocarbons, pyrene

発表責任者：野尻　秀昭（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2J27p03
講演日時：3 月 18 日 14:30～ J 校舎 27 会場

化学窒素肥料の効率的利用に向けたカビ脱窒阻害剤のスクリーニング
Screening for fungal denitrification inhibitors toward effective utilization of nitrogen fertilizer
○松岡 真生[1]、Ashutosh Kumar[2]、Muhammad Muddassar[2]、松山 晃久[1,3]、Kam Y. J. Zhang[2]、吉田 稔[1,3,4]（[1]理研・CSRS・ケミカルゲノミクス研究グループ、[2]理研・ライフサイエンス技術基盤研究センター、[3]理研・化学遺伝、[4]科学技術振興機構　戦略的創造研究推進事業）
○Masaki Matsuoka[1], Ashutosh Kumar[2], Muhammad Muddassar[2], Akihisa Matsuyama[1,3], Kam Y. J. Zhang[2], Minoru Yoshida[1,3,4] ([1]RIKEN Center for Sustainable Resource Science, Chemical Genomics Research Group, [2]RIKEN Center for Life Science Technologies, [3]RIKEN, Chemical Genetics Laboratory, [4]Japan Science and Technology Corporation, CREST Research Project)

近年、化学窒素肥料の農耕地への大量投与が土壌汚染や地下水汚染、大気汚染等を引き起こしている。そのなかでも、強力な温室効果ガスでありオゾン層破壊物質でもある亜酸化窒素 $N_2O$ の農耕地からの放出は、その対策の緊急性を要する深刻な環境問題である。農耕地からの $N_2O$ 産生の主たる原因は土壌微生物による脱窒であり、それは植物に利用されていない余剰肥料からもたらされたものと考えられる。$N_2O$ 産生に関与する土壌微生物のなかでもカビの脱窒による影響は極めて大きいとされるが、その要因は、カビには $N_2O$ 還元酵素（$N_2Or$）が存在しないためにカビ脱窒による最終産物が $N_2O$ である、ということにある。そこで、本研究では、化学窒素肥料の効率的利用並びに農耕地からの $N_2O$ 削減を目指し、カビの脱窒の鍵酵素である亜硝酸還元酵素 NirK の活性を阻害する化合物のスクリーニングを行なった。

まず、スクリーニングを行なう前に、96 穴マイクロプレートで簡便に阻害化合物を識別できるように、糸状菌 *Fusarium oxysporum* 由来の NirK 酵素を用いて酵素活性の阻害度を評価する in vitro のアッセイ系と、*F. oxysporum* を用いて脱窒活性の阻害度を評価する細胞ベースのアッセイ系を構築した。具体的には、in vitro のアッセイ系においては、NirK の生成物である NO に着目し、NO 検出用蛍光試薬である DAF-2 を用いた系を、細胞ベースのアッセイ系においては、亜硝酸検知試薬である Griess reagent を用いて、脱窒基質である亜硝酸の消費度を阻害評価とする系を構築した。

続いて、カビの NirK の立体構造は明らかになっていないため、カビの NirK とアミノ酸配列の相同性の高く立体構造既知である細菌の NirK の立体構造を鋳型としたホモロジーモデリングを行ない、その構造を基に実行された in silico スクリーニングにより得られたヒット化合物に関して in vitro のアッセイ系を用いて阻害評価を行なった。結果として、濃度 30 μM において化合物 11 種に強い NirK 阻害活性が見られ、そのうち化合物 9 種が 10 μM 以下の $IC_{50}$ 値を有していた。強い NirK 阻害活性の見られた化合物を in vivo のスクリーニングに供したところ、化合物 2 種がカビ脱窒阻害剤として同定された。

今後、本研究のスクリーニングにより得られたヒット化合物を基に、より効果的でかつ安全なカビ脱窒阻害剤を開発し、化学窒素肥料と共に阻害剤を農耕地に投与することができれば、$N_2O$ の大気中への放出を抑制すると同時に、化学窒素肥料を効率的に植物に取り込ませ、投与する肥料を削減することが期待できる。

fungal denitrification, NirK, nitrogen fertilizer

発表責任者：松岡真生（masaki.matsuoka@riken.jp）

講演番号：2J27p04
講演日時：3 月 18 日 14:45～ J 校舎 27 会場

# Burkholderia sp. KU-46 株による 4-ニトロ安息香酸および 4-アミノ安息香酸の分解
# Degradation of 4-nitrobenzoate and 4-aminobenzoate by Burkholderia sp. strain KU-46.

○田川 須美、岩木 宏明、長谷川 喜衛（関西大化学生命工）
○Sumi TAGAWA, Hiroaki IWAKI, Yoshie HASEGAWA (Kansai Univ)

【目的】

芳香族ニトロ化合物や芳香族ニトロ化合物のニトロ基が還元されてできる芳香族アミノ化合物は、環境中で共存している場合が多いことが推定される。4-ニトロ安息香酸(4-NBA)および 4-アミノ安息香酸(4-ABA)の分解に関しては、*Burkholderia cepacia* PB4 株を供試菌株として報告されているのみであり、十分な知見が得られていないのが現状である。そこで、当研究室で単離した *Burkholderia* sp. KU-46 株は、4-NBA と 4-ABA の両基質を唯一の炭素・窒素およびエネルギー源として利用できることから、KU-46 株による 4-NBA および 4-ABA の分解経路・両基質共存下における分解挙動および分解系遺伝子の探索を行った。

【方法・結果】

KU-46 株の洗浄菌体(4-NBA 培養)を調製し、4-NBA の分解経路について検討した。その結果、4-NBA は洗浄菌体により速やかに分解され、4-NBA の分解に伴いアンモニアとプロトカテキュ酸(PCA)の生成が認められた。さらに、4-NBA 培養菌体から調製した無細胞抽出液中には初発酵素である 4-NBA reductase が存在し、1 mol の 4-NBA に対して 2 mol の NAD(P)H を消費することが分かった。4-NBA の分解については、PB4 株による経路が報告されており、本菌も PB4 株と同様、4-NBA のニトロ基が還元され、4-ヒドロキシアミノ安息香酸を経由し PCA に至ることが明らかとなった。

次に、KU-46 株による 4-ABA の分解について検討した結果、4-ABA は洗浄菌体(4-ABA 培養)により速やかに分解され、4-ABA の分解に伴いアンモニアと PCA の生成が認められた。PB4 株による 4-ABA の分解では、4-ヒドロキシ安息香酸を経由し PCA に至る経路が報告されている。そこで、4-ABA 培養菌体から無細胞抽出液を調製し、4-ABA monooxygenase 活性について検討した結果、4-ABA monooxygenase 活性は認められず、本菌による 4-ABA の分解は、PB4 株と異なる経路であることが示唆された。

また、洗浄菌体を用いて、4-NBA および 4-ABA の分解挙動について検討を行った。その結果、洗浄菌体(4-ABA 培養)による 4-NBA の分解速度は、4-NBA と 4-ABA が共存することにより促進されることが分かった。

*Burkholderia*, 4-Nitrobenzoate, 4-Aminobenzoate

講演番号：2J27p05
講演日時：3 月 18 日 15:00～ J 校舎 27 会場

# 北海道の黒ボク土壌からなる高　$N_2O$ 放出圃場より難培養性 $N_2O$ 放出細菌及び　$N_2O$ 消去細菌の探索

# Search for unculturable $N_2O$ releasing bacteria and　$N_2O$ consumption bacteria in high　$N_2$ field consisting of andosol in Hokkaido.

○高津 祐太、橋床 泰之（北大農）
○Yuta TAKATSU, Yasuyuki HASHIDOKO (Hokkado Univ)

［背景・目的］　亜酸化窒素($N_2O$)は、等モルあたり二酸化炭素の約 300 倍もの強さを示す温室効果ガスであり、21 世紀最大のオゾン層破壊原因物質ともされる安定な気体である。農地からの $N_2O$ 放出量は全体の約 7 割を占め、圃場への大量の化成窒素肥料の投入が $N_2O$ 放出の遠因となっている。多数の報告が、農地や酸性土壌からの $N_2O$ 放出においては、$N_2O$ 還元酵素遺伝子に欠陥があるか、あるいはその遺伝子自体が欠落した脱窒細菌群がおこなう硝酸塩呼吸(不完全な脱窒反応)で、70～90%の $N_2O$ が生成しているとしている。土壌に蓄積した過剰な $NO_3^-$は、多くの場合、降雨後の一時的な嫌気的条件下で脱窒細菌による硝酸塩呼吸に使用され、大量の $N_2O$ として大気中に放出されている。一部の完全脱窒細菌には、土壌ガス中の $N_2O$ を硝酸塩呼吸系における最終電子受容体として利用し、$N_2$ を最終産物として大気中に放出するものも知られている。これらの一連の土壌微生物の振る舞いは、土壌がもつ C/N 比調節能に組み込まれたものであるとの指摘もある。従って、高い $N_2O$ 発生を示す土壌に棲息し、むしろ低い C/N 比を好む土壌細菌の中には、土壌から急激に散逸する $N_2O$ 窒素を系内に留めるべく、土壌ガス中の $N_2O$ を積極的に取り込み、資化的に窒素源として利用するものが存在するのではないかと考えた。本研究では、北海道大学付属静内牧場内の黒ボク土壌からなる圃場より、通常では培養されない $N_2O$ 放出細菌および $N_2O$ 消去細菌の探索を試み、幾つかの菌株の同定を目指した。
［方法・結果］　北海道大学付属静内牧場の圃場から 2016 年 4 月下旬に土壌を採取し、これを 4℃で保存したものを使用した。10 mg 土壌を 10 ml Milli-Q 水に懸濁し、懸濁液 100 µL を $N_2O$ 生成アッセイ用ジェランガム培地に接種後、7～14 日間培養した。ヘッドスペースガス(22.6 mL )をガスクロ分析にかけ、$N_2O$ 放出細菌および $N_2O$ 消去細菌の探索を行った。経時的に $N_2O$ 生成・蓄積量の変動をモニタリングした結果、幾つかのカルチャーでは活発な $N_2O$ 生成が継続的に認められ、一方、1000 ppm レベルから急激に減少する培養物も見出された。これらの培養物から目的の菌株分離を試みると同時に、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)法による菌叢解析を行った。$N_2O$ 放出が活発な培養物の DGGE 解析では、*Massilia* 属細菌が特徴的なバンドとして検出され、この細菌が $N_2O$ 放出の重要なキープレーヤーである可能性を見出した。希釈培養法により、*Massilia* 属細菌はゲル中で特徴的な形態をとりながら生育していることが分かった。一方、2 週目以降 $N_2O$ が大きく減少した培養物でも特徴的なバンドが確認できた。現在、これら菌株の同定および希釈法による純粋分離を試みている。分離に成功したものは，順次，機能性検定に供する予定である。

nitorus oxide, andosol, *Massilia* sp

講演番号：2J27p06
講演日時：3 月 18 日 15:25～ J 校舎 27 会場

# 2.5%NaCl 負荷における生物膜と包括担体を併用した SNAP 法による窒素除去の試み

Attempt of nitrogen removal by SNAP method in combination with biofilm and immobilization carrier under 2.5% NaCl load

○海老根 会、角野 立夫、高品 知典（東洋大院生命）
○KAI EBINE, TATSUO SUMINO, TOMONORI TAKASHINA (Toyo Univ.)

【目的】アナモックス法は、嫌気性アンモニア酸化細菌(アナモックス細菌)によって、アンモニアと亜硝酸を窒素ガスに変換させる反応であり、環境負荷を低減する高効率・省エネルギー型の窒素除去技術として期待されている。従来のアナモックス法では、廃水中のアンモニアの約半量を亜硝酸にする部分亜硝酸化槽と、アンモニアと亜硝酸を窒素ガスに変換するアナモックス槽の 2 槽型で構成されている。近年、更なる省スペース化や設備更新の観点から、1 槽型の SNAP 法が注目されている。SNAP 法とは、部分亜硝酸化反応とアナモックス反応を同一槽内で行う、1 槽型の窒素除去技術である [1)]。我々は、海水程度の NaCl を含んだ窒素含有廃水に対し SNAP 法の適応を検討している。本研究では、まず 2.5% NaCl 条件下でのアナモックス菌群（RUN1、生物膜）と硝化細菌群（RUN2、包括固定）の集積培養をそれぞれ行い、処理特性を検討した。

【方法】アナモックス菌群の集積培養（RUN1、生物膜）には不織布を充填した固定床型リアクター(300mL)を、また、硝化細菌群の集積培養（RUN2、包括固定）には包括担体を 10%充填した流動床型硝化リアクター(1.1L)を用いた。具体的には、RUN1 には館林市Ａ下水処理場の返送汚泥から集積したアナモックス菌群を生物膜担体として投入し培養した。RUN2 の包括担体は群馬県板倉町浄化センターの返送汚泥をポリエチレングリコール系プレポリマーで包括固定（3㎜ 角型担体）したものである。包括担体は亜硝酸型硝化活性を維持するため、加熱担体法で処理した。廃水はすべて合成廃水を使用し、NaCl 負荷を 2.5%まで段階的に上昇させた。原水、処理水の $NH_4$-N、$NO_2$-N、$NO_3$-N を分析し処理特性を評価した。

【結果】アナモックス菌群の集積培養（RUN1、生物膜）では、容積負荷 0.24kg-N/$m^3$/d で運転を開始した。246 日間の馴養期間を経て、1.31kg-N/$m^3$/d まで窒素馴養を行い、T-N 除去速度 1.00kg-N/$m^3$/d を得た。その後、NaCl 馴養を行い、233 日間の馴養期間を経て、淡水系の状態から 2.5% NaCl 負荷までの馴養を完了した。硝化細菌群の集積培養（RUN2、包括固定）では、容積負荷 0.20kg-N/$m^3$/d・0.36% NaCl 負荷 0.36%で運転を開始した。その後、112 日の馴養期間を経て、硝化速度 0.20kg-N/$m^3$/d・2.5% NaCl 負荷までの馴養を完了した。今後は、RUN2 に RUN1 の生物膜担体を投入し、SNAP 槽（RUN3）として運転を行い、更なる処理特性を検討する予定である。

1） K. Furukawa et al. Development of single-stage nitrogen removal using anammox and partial nitritation (snap) and its treatment performances. Water Sci Technol, Vol.53, No.6, pp. 83–90 (2006)

SNAP, ANAMMOX, NaCl

発表責任者：海老根 会（s39101500032@toyo.jp）

講演番号：2J27p07
講演日時：3 月 18 日 15:40～ J 校舎 27 会場

# 作業現場を想定した簡便な蛍光誘導体化反応条件による芳香族アミンの高選択的分析法の開発

# Development of highly selective analytical methods of aromatic amine by simple fluorescence derivatization for working environment.

○井上 直子（労働者健康安全機構　安衛研）
○Naoko Inoue (JNIOSH)

【背景と目的】

芳香族アミンは樹脂や色素等の原料として使用されており，発がん性が懸念される化合物が多い．その一部は PRTR 制度の対象物質や，労働安全衛生法での使用禁止物質や特定化学物質として指定されている．芳香族アミンの作業環境測定では HPLC や GC 等が分析に用いられ，捕集は液体又はろ過捕集により行う．ろ過捕集による試料は有機溶媒に溶解し，共存物質との分離を目的とした操作を特に行わずに HPLC 等の分析に用いるため(（社)日本作業環境測定協会，ガイドブック　特定化学物質関係)，樹脂製造作業場などフェノール類が存在する場合には，分析結果への影響が懸念される．本研究では液体及びろ過捕集法に適用可能で，誘導体化後に分液や濃縮操作等の無い，簡便・迅速・高選択的な芳香族アミンの蛍光誘導体化法の開発を目的として，芳香族アミン類(2,4-diaminotoluene，*o*-tolidine，4,4'-diamino-3,3'-dimethyl-diphenylmethane，*o*-toluidine，*o*-ethylaniline，*o*-anisidine，*o*-xylidine)，フェノール類及び非芳香族アミン類を用いて，4-(*N*-Chloroformylmethyl-*N*-methylamino)-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole(NBD-COCl)による芳香族アミンの水溶液中での選択的な誘導体化反応条件の検討を行った．

【方法】

誘導体化条件の検討は，試験管に 0.1M ホウ酸，リン酸又は酢酸緩衝溶液(pH4.0-9.0)，芳香族アミン，フェノール類及び非芳香族アミン(アセトニトリル(MeCN)水溶液(aq.)または MeCN)，誘導体化試薬 NBD-COCl-MeCN を加え，密栓し，30-60℃で反応を行い，氷冷後，酢酸 MeCN aq.で希釈し，HPLC(FL: ex470nm /em540nm)により分析した． HPLC 条件は移動相(MeCN 50/蒸留水 50(v/v))，流速 1 mL/min，カラム(Kinetex C18 または Kinetex Phenyl-Hexyl，5μm，100mm×4.6mm)を用いた．また，標準品として芳香族アミン誘導体を合成し，単離・精製後，NMR 及び質量分析により構造を確認した．

【結果と考察】

MeCN を含む pH5.0 緩衝溶液中で，芳香族アミンのみが選択的に NBD-COCl により誘導体化され，定量的に測定する事が可能であった．また，模擬試験として芳香族アミンの捕集に用いられる硫酸含浸フィルターへ芳香族アミンを添加し，回収・誘導体化により、定量することが可能であった(20-400 ng /filter or mL，気中濃度(40L 捕集)に換算して 0.5-10 μg/m$^3$)．

carcinogenic aromatic amine, selective analysis, working environment

発表責任者：井上直子（inoue@h.jniosh.johas.go.jp）

講演番号：2J27p08
講演日時：3 月 18 日 15:55～ J 校舎 27 会場

# 微生物を利用した新規汚泥減容化システム
# Novel method of sludge reduction by using microorganisms

○柳瀬 亜美[1]、杉村 寿將[1]、黒住 悟[2]、石田 秀樹[2]、倉根 隆一郎[1]([1]中部大学、[2]積水アクアシステム（株））
○Ami Yanase[1], Hisanobu Sugimura[1], Satoru Kurozumi[2], Hideki Ishida[2], Ryuichiro Kurane[1]([1]Tyubu Univ., [2]Sekisui Aqua Systems Co.,Ltd)

［目的］
日本の下水処理およびし尿処理のほとんどが活性汚泥法によるものである。それらの施設では、処理の過程で余剰汚泥が大量に発生する。発生した余剰汚泥は脱水、焼却、埋め立て等によって処分されるが、高コストや悪臭などの問題を抱えており、余剰汚泥の削減が求められている。現在、余剰汚泥を削減するために様々な方法が開発されているが、従来のエンジニアリング的な手法では設備コスト、エネルギーコストともに負担が大きくなることから普及には至っていないのが現状である。そこで、微生物学的な面からアプローチを行うことにより、より省エネルギー・低コスト化を可能とする新たな汚泥減容化技術を開発することを目的とした。今回は、汚泥削減効果を発現する微生物の菌学的性質と生産する酵素の機能の解明を目的とした。
［方法］
活性汚泥から分離した汚泥減容に関与する微生物の酵素活性を調査するために、プロテアーゼ活性試験およびアセチル化反応試験を行った。そして、これらの微生物の同定および菌学的性質を解明するために、16SrDNA 塩基配列解析を行った。
［結果］
本微生物は高いプロテアーゼ活性およびアセチル化能を示した。酵素活性および同定結果に関して報告する。

microorganism, sewage treatment, enzyme

講演番号：2J27p09
講演日時：3 月 18 日 16:10～ J 校舎 27 会場

# 細胞性粘菌の持つ線虫忌避効果について

# Repellent effect of cellular slime molds against parasitic nematodes

○白神 美菜子[1]、永松 ゆきこ[2]、齊藤 玉緒[3] ([1]上智大院・理工、[2]パネフリ工業株式会社、[3]上智大・理工)
○Minako Shiraga[1], Yukiko Nagamatsu[2], Tamao Saito[3] ([1]Graduate School, Sophia Univ., [2]Panefri Industrial Co.,Ltd, [3]Sophia Univ.)

＜背景・目的＞

細胞性粘菌と線虫は生息域が同じであること、種によっては餌を争うこと、また野外から細胞性粘菌を単離しようとすると必ず線虫が混入していることなどから両者の間には何かしらの相互関係を持つことが予想された。また 1996 年には細胞性粘菌がその発生段階によって自活性線虫を誘引したり忌避させたりすることが報告されている。
以上の結果から、細胞性粘菌と線虫の相互関係を調べるために、作物に大きな被害を与えている植物寄生性線虫を用いた。その結果、細胞性粘菌は寒天上で植物寄生性線虫を忌避させることが示された。この現象に基づき線虫の誘引・忌避を解析するアッセイ法を構築し、細胞性粘菌から得た細胞抽出物と既に線虫を忌避させることで知られている硝酸カリウムを用いて忌避効果を比較した。また自活性線虫に対する忌避効果を持つと知られる化合物を用いて、植物寄生性線虫に対する影響を調べた。

＜方法・結果＞

ろ紙に細胞抽出液ないしは硝酸カリウムを染み込ませ乾燥させたものを、直径 5 cm のリン酸緩衝液を含む phytagel medium の端にのせた。ろ紙から離れたところに滅菌処理した線虫を 5~10 匹播種し、17 時間程暗所で静置した。その後、顕微鏡を用いて撮影し画像解析により忌避効果を算出した。
上記のようなアッセイ法を用いて 6 mg から 3 μg まで段階希釈した硝酸カリウムを含むろ紙を作製し、忌避活性を測定した。これを元に忌避の程度を割合で示し検量線を作製した。これを基準として混合物である細胞性粘菌抽出物の活性を測定したところ、硝酸カリウムの 10 倍の濃度で同程度の忌避活性を示すことが分かった。以上の結果は細胞性粘菌が植物寄生性線虫に対して、強い忌避を引き起こすことを示唆している。

Chemical communication, Nematode, Cellular slime mold

講演番号：2J27p10
講演日時：3 月 18 日 16:25～ J 校舎 27 会場

# 農地土壌環境の特性解析および環境改善方法の検討

# Analysis and improvement of agricultural soil environment

○山﨑 透、荒木 希和子、久保 幹（立命大生命）
○Toru YAMASAKI, Kiwako S. ARAKI, Motoki KUBO (Ritsumeikan Univ.)

【背景・目的】　土壌環境は物理性・化学性および生物性によって特徴づけられる。土壌肥沃度指標(SOFIX)は土壌の微生物の数や活性化に着目した土壌の肥沃度の評価指標である。微生物活性に関わる指標(全炭素量、全窒素量、C/N 比)や、微生物活性を示す指標(総細菌数、窒素循環活性、リン循環活性)に基づき土壌環境を評価し、これらの値を適正値に近づけることで物質循環が促進され、作物の生育に適した環境となる。近年、効率的な作物生産のため、多くの農地では化学肥料や農薬を用いた化学農法が行われている。しかし、化学物質の連用は土壌微生物の働きを低下させるため、土壌の肥沃度の低下が懸念される。本研究では、現在の農地土壌環境の傾向を明らかにするため、日本の農地土壌の SOFIX 分析値を解析した。そして、微生物数の著しく減少した土壌においても有機農法への転換を図るため、農薬を長期間使用した土壌での微生物の回復を試みた。
【方法】　日本全国の農地 760 地点から土壌を採取し、SOFIX 分析(全炭素量、総細菌数など計 19 項目)を行った。そのうち、長期にわたる土壌燻蒸剤の使用で細菌が検出されない圃場において、農薬の使用を止め、土壌の総細菌数、窒素循環活性、リン循環活性の経時変化を分析した。さらに、農薬による土壌消毒がなされた土壌と消毒がなされていない土壌に、有機資材を投入し、炭素量と窒素量を適正な値に向上させた上で、様々な資材を投入し、総細菌数の経時変化を分析して、有効な資材の探索を行った。
【結果・考察】　SOFIX 分析のうち、全炭素量と総細菌数の関係を解析したところ、総細菌数、全炭素量それぞれの平均を共に下回る土壌は全体の 43%に及ぶことが分かった。特に、総細菌数が検出限界以下($6.6\times10^6$ cells/g)であった土壌も全体の 16%であった。この傾向は、農薬による消毒や化学肥料による施肥が原因であると考えられ、日本の多くの畑では土壌の肥沃度が低いことが明らかになった。また、農薬の使用を止めた土壌では僅かに生物性の向上が確認された。よって、長年の農薬を使用した土壌では消毒の影響が強く、短期間での回復は困難であると考えられる。土壌に様々な資材を投入した結果、炭素量と窒素量を向上させただけでは総細菌数の増加が確認できなかったのに対し、油粕や菜種粕を投入した土壌では総細菌数の向上が確認され、ペレット資材に木材資材と菜種粕を混合させた資材で総細菌数が最も向上した。以上より、日本の農地では、化学農法の連用により微生物が少ない土壌が非常に多いことが明らかになり、減少した微生物を回復させることは容易ではないが、それらを回復させる資材には未発酵資材が有効であることが期待される。

agricultural field, pesticide, bacterial biomass

発表責任者：久保幹（kubo@sk.ritsumei.ac.jp）

講演番号：2J27p11
講演日時：3 月 18 日 16:50～ J 校舎 27 会場

# 有機資材中で増殖させた炭化水素分解菌を用いたバイオレメディエーション
# Bioremediation with hydrocarbon degrading bacteria increased in biomass

○川村 瑞穂、荒木 希和子、久保 幹（立命大生命）
○Mizuho KAWAMURA, Kiwako S. ARAKI, Motoki KUBO (Ritsumeikan Univ.)

【背景・目的】炭化水素分解菌を用いたバイオレメディエーションでは、細菌の栄養源となる無機塩を投与することで石油系炭化水素の浄化が促進される。しかし、投入した炭化水素分解菌は一時的に増加するものの、4 週間ほどで大半が死滅する。従って、十分な汚染浄化のためには炭化水素分解菌の活性化及び定着期間の長期化が必要とされている。先行研究では、無機塩に代わってバイオマス（有機資材）を投入したところ、無機塩の投与時に比べて菌数の保持時間が延長した。そこで、従来の発酵槽を用いた培養に代わり、炭化水素分解菌の生育に適したバイオマスを用いて炭化水素分解菌を増殖させ、そのバイオマスを汚染土壌へ投入することで菌数の保持時間をさらに延長させることを考えた。本研究では、炭化水素分解菌である *Rhodococcus erythropolis* NDKK6 を増殖させた、バイオレメディエーションを活性化する「NDKK6 株含有バイオマス」を開発することを目的とした。
【方法・結果】*R. erythropolis* NDKK6 は、難分解性の長鎖シクロアルカンを唯一の炭素源として生育可能な炭化水素分解菌である。NDKK6 株を増殖させるバイオマスとして、予備実験で最も NDKK6 株を維持・活性化した大豆かす・ピートモスの混合バイオマス（C/N 比 20）を用いた。

C/N 比を 20 に調整した 2 種類の混合バイオマス（大豆かす・ピートモス、牛糞堆肥・鶏糞堆肥）を作製した。炭化水素汚染土壌（ベースオイル: 5,000 mg/kg-soil）に、(1) NDKK6 株を増殖させた大豆かす・ピートモスを投入する条件、(2) NDKK6 株と大豆かす・ピートモスを別々に投入する条件、(3) NDKK6 株と牛糞堆肥・鶏糞堆肥を別々に投入する条件で処理した。NDKK6 株数はバイオマスとの混合時に $1\times10^6$ cells/g に調整した。各土壌を 30 ℃で静置し、総細菌数と NDKK6 株数の 4 週間の経時変化を調べた。また、培養前後のベースオイル濃度を測定した。その結果、牛糞堆肥・鶏糞堆肥を用いた条件（3）で NDKK6 株数が増加した。一方、ベースオイル濃度は条件（1）で最も減少し、その分解率は 42%であった。このことから、NDKK6 株含有バイオマス及び堆肥を共に投入することで、土壌中の NDKK6 株をより活性化できると考えた。そこで、最も効率的なバイオレメディエーションの条件を決定するため、（4) NDKK6 株を増殖させた大豆かす・ピートモスと牛糞堆肥・鶏糞堆肥を炭化水素汚染土壌に投入する条件で、同様の実験を行った。その結果、新たに用意した条件（4）で総細菌数及び NDKK6 株数が最も増加し、また、ベースオイル濃度も最も減少した（ベースオイル分解率: 62%)。これらの実験結果から、バイオマス中で炭化水素分解菌を増殖させ、汚染土壌へ投入することにより、効率的及び経済的なバイオレメディエーションが行えることが期待される。

Bioremediation, Hydrocarbon degrading bacteria, *Rhodococcus erythropolis*

発表責任者：久保　幹（kubo@sk.ritsumei.ac.jp）

講演番号：2J27p12
講演日時：3 月 18 日 17:05～ J 校舎 27 会場

# Utilization of waterweed to improve the quality of aquatic environment

○ Lutfi NIMATUS SALAMAH, Takuji HANASHIRO, Kiwako S. ARAKI, Motoki KUBO (Ritsumeikan Univ.)

[Introduction] Ocean and river have its own purification mechanism, called self-purification, through water flow to maintain the nutrients balance. Unlike ocean and river, water flow in lake and pond is limited (static), creating unefficient self-purification. Therefore, a new water treatment system based on material circulation was constructed for purification of a static water. The system has both relatively aerobic and anaerobic columns in addition to slow water circulation mechanism. The system was reduced Total Carbon (TC), and Total Nitrogen (TN) of the water. However, Phosphorus (P) and Potassium (K) are still remaining. Unlike nitrogen and carbon cycles, P and K does not enter the atmosphere, but remaining on water ad sediment. Too high amount of P and K in the water and sediment might be harmful in the aquatic environment, such as decreases the dissolved oxygen followed by the increase of chemical oxygen demand in the water. In the purpose of nutrient reduction, waterweeds are known to be effective to remove P and K as absorbing for their growth. However, there is lack information of the most suitable waterweed to remove it. This study aimed to know the type of waterweed having the highest ability to reduce them in the water and sediment of aquatic environment.
[Methods and Results] Sediment and water samples were collected from Kitanoshin pond in July 2016. Five types of waterweeds were also collected from natural water area. Five species of (*Phragmites australis, Egeria densa, Bacupa myriophylloides, Eichornia crassipes* and *Limnobium laevigatum*) were cultivated in pots containing 2.5 kg sediment and 4L water as the treatments. Water and sediment samplings were perfomed at 0, 7, 14, 21 and 28 days to analyze Total Phosphorus (TP), Total Potassium (TK), and bacterial number. As a result, TP and TK of sediment and water were decreased in all treatments. The highest TP and TK removal in sediment were shown in pots of *E. densa* (28.7% and 16.8%, respectively), while the lowest TP and TK were removed in control (5.7% and 6.2%, respectively). The highest TP and TK removal in water were shown in a treatment using *E. densa* (61.5% and 37.1%, respectively), while the lowest were shown in control (2.3% and 5.2%, respectively). The highest TP and TK were detected in plants of *E. densa* (1,040mg/kg and 10.35mg/kg, respectively). This result suggests that *E. densa* has the highest ability to absorb P and K, than the other waterweeds. The total bacterial number in sediment was also high in treatment using *E. densa* ($18x10^8$ cell/g-sediment). This result indicates that TP and TK removal in the sediment might be correlated with the high bacterial number. This experiment revealed that *E. densa* was the most suitable waterweed to improve the water quality of aquatic environment.

aquatic environment, purification, waterweed

発表責任者：KUBO Motoki（kubo@sk.ritsumei.ac.jp）

講演番号：2J27p13
講演日時：3 月 18 日 17:20～ J 校舎 27 会場

# Evaluation of a new water treatment system in a natural water environment

○Ima Yudha Perwira, Kiwako S Araki, Motoki Kubo (Fac. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

[Introduction] A new water treatment system has been developed to purify water from a natural pond by using water circulation, relatively aerobic and anaerobic microbial columns. The relatively aerobic microbial columns are functioned to reduce carbon content, while relatively anaerobic microbial columns are functioned to reduce nitrogen content in the water. In a small scale (200 L) experiment, the system successfully reduces chemical oxygen demand (COD), total carbon (TC), and total nitrogen (TN) of water. It is needed for the system to be evaluated in a real natural water environment. In this experiment, we applied a large scale system at natural pond to assess the efficiency of the new water treatment system.

[Methods and results] Experiments were carried out in Kitanoshin pond (area: 1,716 $m^2$) located in Kusatsu, Shiga, Japan. The new water treatment system was applied in the pond to circulate $5.25 \times 10^6$ L of water. Water and sediment samples were collected in highly circulated and less circulated areas in Kitanoshin pond from July 2015 to July 2016. Chemical oxygen demand (COD), total carbon (TC), and total nitrogen (TN) in water and total bacterial number in sediment were analyzed. COD of water was analyzed using permanganate titrimetric method, while TC and TN of water were analyzed by using TC and TN analyzer. TN in sediment was analyzed using indophenols-blue method, TC was analyzed using TC analyzer, and total bacterial number was analyzed using low stirring method. TC of water was increased from summer 2015 (6.13 mg/L) to summer 2016 (6.36 mg/L), and TN was increased from 0.5 mg/L to 0.9 mg/L. However, COD of water was decreased from 6.9 to 6.2 mg/L. TC of sediment was decreased from 5700 to 5400 mg/Kg-dry soil, and TN of sediment was decreased from 970 to 890 mg/Kg-dry soil. Thus, total bacterial number in sediment was increased from 7.1 to $9.5 \times 10^8$ cells/g-soil. These results suggest that the new water treatment system efficiently promotes the decomposition of organic materials in sediment, and then improves the water quality of the natural pond.

material circulation, water treatment system, natural water environment

講演番号：2J27p14
講演日時：3 月 18 日 17:35～ J 校舎 27 会場

閉鎖系水域における有用微生物群による水質浄化と環境影響の評価
Evaluation of water purification and environmental impact in the closed water area by effective microorganisms.
○三木 翔平、伊藤 秋実、山本 真輝、坂上 吉一、森 美穂（近大農）
○Syouhei MIKI, Akimi ITO, Masaki YAMAMOTO, Yoshikazu SAKAGAMI, Miho MORI (Kindai Univ.)

【背景と目的】
有用微生物群（Effective Microorganisms：略称 EM）は、食品由来の微生物であることや使用経験上悪影響がみられなかった、という根拠に基づいて、特に使用方法や量の規制がない状態で、世界中において使用されている。その使用は、我々の身近な居住環境であるトイレやお風呂の掃除、農業や水質浄化など多岐にわたっている。しかしながら、実環境中における EM の効果を実証した報告や、使用による環境生態系への影響評価に関する詳細な報告は非常に少ない。本研究では水質浄化における EM の使用に着目し、*in vitro* 試験と野外試験を実施し、EM の野外環境中での水質浄化効果と微生物に及ぼす影響評価を行った。
【方法と結果】
*In vitro* 試験では人工汚水 100ml に対して EM 活性液の割合を変えた系を作製し、全量 200 ml スケールで水質浄化試験を行った。その結果、EM 1/100 量を添加した時、コントロールよりも COD、全リン、全窒素はそれぞれ約 1/4、1/2、および 2/3 の濃度以下となり、浄化効果が認められた。
野外試験は 2016 年 7 月から奈良市の池（水量：211,716 $m^3$）で実施し、EM 培養液を 1 t と EM 団子（EM 活性液、EM ボカシ、EM-X セラミックパウダー、土を約 200：200：1：1000 の比率で混ぜて 1 ヶ月発酵させたもの）1000 個を投入した。経時的に滅菌したハイロート採水器を用いて水を採取し、温度、pH、DO、COD、全リン、全窒素、クロロフィル a および生菌数の測定を行った。また、生菌数測定は散布した地点の水深約 4 m の土壌について行った。その結果、COD、全リン、全窒素、クロロフィル a および生菌数は、散布 1 日後に影響がみられたが、2 日後には散布前とほぼ同様の値になり、EM 投入による影響はその後認められなかった。現在、採取した土壌を用いて DGGE による菌叢解析を行っている。

water purification, effective microorganisms, environmental impact

発表責任者：森　美穂（mori_m@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：2J27p15
講演日時：3 月 18 日 17:50～ J 校舎 27 会場

# 地球温暖化により消滅の危機にあるサンゴ礁の修復（その 1） ― Redox nanoparticle による高温ストレス下でのサンゴ幼生の生存率の向上 ―

# Repair of the crisis of coral reef destruction by global warming: increased survival rate of redox nanoparticle-treated coral larvae under heat stress

○元根 啓佑[1]、高木 俊幸[1,2]、油屋 駿介[1,2]、新里 宙也[3]、長崎 幸夫[4]、竹山 春子[5]、青木 航[1]、植田 充美[1]（[1]京大院農、[2]日本学術振興会特別研究員、[3]OIST、[4]筑波大院数理物質、[5]早稲田大理工）
○Keisuke MOTONE[1], Toshiyuki TAKAGI[1,2], Shunsuke ABURAYA[1,2], Chuya SHINZATO[3], Yukio NAGASAKI[4], Haruko TAKEYAMA[5], Wataru AOKI[1], Mitsuyoshi UEDA[1] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]JSPS, [3]OIST, [4]Grad. Sch. Pure Appl. Sci., Univ. Tsukuba, [5]Dept. Sci. Eng., Waseda Univ.)

【背景と目的】
サンゴ礁は全海洋生物種の約25%が生息し、地球上で最も生物多様性の豊かな環境の一つになっている。サンゴ礁を構成するサンゴは刺胞動物に分類され、プラヌラと呼ばれる幼生の時期を経て、親サンゴへと成長していく。しかし近年、地球温暖化に伴う海水温上昇などの影響でサンゴが死滅する観察例が世界中で多数報告されており、世界のサンゴの約3分の1の種が絶滅の危機にあると言われている。サンゴの死は、サンゴ礁に生息する多種多様な生物の消滅にもつながるため、早急な対応技術の開発が求められている。

【方法と結果】
高温ストレスによりサンゴの細胞内で産生した活性酸素種が細胞に損傷を与えていると考え、活性酸素種を消去するために設計された Redox nanoparticle（RNP）の活用を検討した。RNP は、中分子量ポリマーに抗酸化剤であるニトロキシドラジカルが共有結合した構造をとっており、正常細胞の電子伝達系などに障害を与えず、過剰に産生した活性酸素種のみを選択的に除去することが可能である。33 度の高温条件下で飼育したサンゴ *Acropora tenuis* のプラヌラ幼生に対して RNP を投与したところ、生存率の向上が認められた。また、我々が開発してきたモノリスカラムを用いたプロテオーム解析により、RNP の投与により活性酸素種の産生に応答するタンパク質群の生産が減少していることが明らかになった。これらの結果から、RNP が過剰な活性酸素種を消去することで、高温ストレス下におけるプラヌラ幼生の生存率の向上に寄与していると考えられた[1]。

[1] Motone *et al*., submitted.

coral, heat stress, reactive oxygen species

講演番号：2J27p16
講演日時：3 月 18 日 18:05～ J 校舎 27 会場

# 高原野菜における環境保全型二毛作を目指した好熱菌発酵産物の効果検証

# The effects of the thermophile-fermented product on highland vegetables for sustainable double cropping.

○新海 一禎[1]、原田 真梨子[2,3]、平田 敏章[2,3]、仲島 圭亮[2,3]、姜 赫[2,3]、宮本 浩邦[4,5]、原田 徹[2,3]([1]新海農園、[2]原田アグロビジネス、[3]サプリーナファーム、[4]サーマス、[5]千葉大・融合)
○Kazuyoshi SHINKAI[1], Mariko Harada[2,3], Toshiaki Hirata[2,3], Keisuke Nakajima[2,3], Hyoku Kan[2,3], Hirokuni Miyamoto[4,5], Tooru Harada[2,3] ([1]Shinkai farm, [2]Hard Agro., [3]Supplina Farm, [4]Sermas, [5]Chiba Univ.)

【背景・目的】我々は好熱菌群によって海産資源を75℃前後で発酵した産物(以下、好熱菌発酵産物)の圃場現場における効果を長年検証している。当該発酵産物は植物の成長促進 (Plant growth-promoting rhizobacteria;PGPR) 効果が示唆されており (**JGAM**, **97**:1349-1359, 2015)、土壌と植物体中の硝酸濃度の低減化制御(**AMB**, **97(3)**:1349-1359,2013)や植物由来の生理活性物質の濃度制御をはじめとして、これまでに本学会にて継続的に報告がなされている (2006～2015年・日本農芸化学会)。本研究では、高原野菜として知られるレタスと白菜の二毛作を環境保全型の栽培によって管理することを目指して、発酵産物の施用効果を解析している。特に、発酵産物と有機リン系化学農薬クロルピクリンの土壌潅注施用による栽培特性を比較することによって、発酵産物の適用性を検証した。
【結果】一毛作目においてレタスを栽培し、慣行区、クロルピクリン処理区、並びに発酵産物処理区において、全重量と調整重量を比較した(n=30)。その結果、全重量は、無処理区<発酵産物処理区<クロルピクリン処理区の順で有意差を持って、クロルピクリン処理区の全重量が大きくなった。しかしながら、外葉を除去した調整重量(出荷重量)では、発酵産物処理区とクロルピクリン処理区間に有意な差は認められなかった。又、地下部重量についても、両処理区間に差異が認められなかった。二毛作目の白菜については、全重量及び調整重量ともに、発酵産物処理区が慣行区ならびにクロルピクリン処理区を有意に上回った (n=50)。又、地下部重量については、慣行区に比べ発酵産物処理区及びクロルピクリン処理区が上回ったが、両処理区間の差は認められなかった。これらの結果は、クロルピクリンに依存することのない環境保全型の二毛作の視点において、好熱菌発酵産物は経済性を伴う高い実用性を有する可能性があることを示唆している。さらに、栄養学的な側面から捉えても、発酵産物処理区では、作物側の栄養成分において、硝酸含量が少なく、抗酸化成分が増える傾向が確認されており、その他の栄養機能成分、作物の生長を制御する機能性タンパクの発現量などについての解析結果も併せて報告する。

thermophile, vegetable, sustainability

発表責任者：原田徹（toru-h@ytg.janis.or.jp）

講演番号：2J28a01
講演日時：3 月 18 日 09:20～ J 校舎 28 会場

# レアメタルの持続可能な利用を目的とした酵母によるモリブデンの選択的回収・濃縮システムの構築

Construction of a selective molybdenum recover and concentrate system using *Saccharomyces cerevisiae* aims to sustainable rare metal utilization

○池田 直也[1]、簡 梅芳[1]、久保田 健吾[2]、井上 千弘[1]（[1]東北大院・環境、[2]東北大院・工）
○Naoya IKEDA[1], Mei-Fang CHIEN[1], Kengo KUBOTA[2], Chihiro INOUE[1] ([1]Graduate School of Enviromental Studies, Tohoku University, [2]Graduate School of Engineering, Tohoku University)

【目的】

レアメタルは幅広い分野で使用されており、構造材料への添加材（Mo, Nb）や発光ダイオード・電池（Ni, Co）、永久磁石（Nd, Dy）といった最先端技術には欠かせない存在とされている。しかし、レアメタルの自然界の賦存量や濃度が稀であり、かつ産業廃棄物や排水に含まれるレアメタルの濃度も低いため、現在行われている化学的処理による回収費用は高く、環境負荷も大きいという問題がある。レアメタルの持続可能な利用を実現するため、本研究は低コスト・低環境負荷でレアメタルを選択的に回収・濃縮するシステムの開発を目的として行った。

【実験方法】

本研究ではモリブデンをレアメタルの最初のターゲットとした。大腸菌由来のモリブデン応答タンパク質 ModE を結合タンパク質に選定し、ModE の C 末端配列と細胞表面に分泌・固定する配列を一つの融合遺伝子としてプラスミドに構築した。構築したプラスミドを酵母に導入し、導入した形質の細胞表面での発現は間接免疫蛍光法で蛍光顕微鏡により確認した。また、84 時間培養した酵母（乾燥重量 0.03 g）を 100 mM のモリブデン酸ナトリウム溶液において 2 時間吸着させ、モリブデンの吸着量を ICP-AES で測定した。

【結果と考察】

蛍光顕微鏡による解析結果から、導入した融合遺伝子の細胞表面での発現が確認できた。また ICP-AES の測定結果から、形質転換株のモリブデン吸着量は野生株の 9 倍であり、溶液中 17%のモリブデンが吸着されたとわかった。現在、タンパク質の発現量およびモリブデンの吸着量の増加をはかり、プラスミド上に既存のプロモーター*TEF1* を *modE* のプロモーター*modAp* に置換し、それによる発現量・吸着量の変化およびモリブデン存在下の発現促進効果を評価中である。

bioadsorption, molybdenum, *Saccharomyces cerevisiae*

発表責任者：簡　梅芳（meifangchien@tohoku.ac.jp）

講演番号：2J28a02
講演日時：3 月 18 日 09:35～ J 校舎 28 会場

# 海洋生物から分離された好気性セレン酸還元菌の諸性質

# Isolation and characterization of marine microbes capable of reducing selenate under aerobic conditions

○阪口 利文[1,2]、田中 星奈[1]、馬越 智也[2]、岡村 好子[3]、石川 輝[4]、田口 和典[4]（[1]県立広島大生命科、[2]県立広島大環境科、[3]広島大院先端物質、[4]三重大院生物資源）
○Toshifumi SAKAGUCHI[1,2], Seina TANAKA[1], Tomoya UMAKOSHI[2], Yoshiko OKAMURA[3], Akira ISHIAKWA[4], Kazunori TAGUCHI[4] ([1]Dept. of Life Sci., Pref. Univ. of Hiroshima, [2]Dept. Environ. Sci., Pref. Univ. Hiroshima, [3]Grad. Sch. Adv. Sci. Mat. Hiroshima Univ., [4]Grad. Sch. Biores., Mie Univ.)

【目的・背景】セレンは地殻や生体構成元素として地圏・生物圏に幅広く分布する元素であると同時に、着色・電子材料などの工業材料や栄養補助食品に利用される産業分野にとっても重要な元素である。微生物との関連ではセレンアニオンは嫌気呼吸における最終電子受容体として利用できることが判明しており、多くの微生物種においてセレン酸の嫌気呼吸の存在が知られている。これに対して、嫌気条件以外でのセレン酸の微生物還元については *Pseudomonas stutzeri* において好気条件での元素体セレンへの変換が知られており、セレン酸の回収・変換に嫌気処理を必要としない生物材料として活用が期待されている。また、呼吸鎖とは異なるセレン酸還元の代謝プロセスの存在示唆されている。そこで、本研究では多様な生物相、環境を有する海洋に着目し、三重大学実習航海船、勢水丸による海洋調査航海を通じて採取した海洋生物試料などから好気条件でのセレン酸還元が可能な微生物の探索、分離を実施した。さらに、16SrDNA の塩基配列に基づく分離株の系統分類ついて調査した。
【方法・結果】本研究では伊勢湾、遠州灘、東シナ海などの海洋調査航海で採取された様々な生物試料、海水、泥質試料を用いて目的微生物の分離を行った。セレン酸を含む分離培地のプレートに採取試料を船上で素早く植菌した。その後、ラボに持ち帰り好気的な条件において 25°C でインキュベートし、セレン酸還元によって生じた元素体セレン特有の赤色コロニーの形成を指標として目的微生物を分離した。分離後、分離株に対して光学・電子顕微鏡による観察、生化学特性、分子系統解析を調査した。また、好気的条件でのセレンオキサニオンの還元とセレンナノ微粒子の形成について調査した。その結果、遠州灘で採取されたサルパから *Acidovorax* 属に分類される（SSe6-1 株）分離株や東シナ海のトロールで漁獲されたホウボウの一種であるカナドの内蔵から *Shewanella* 属に分類される（KND-1 株）分離株において好気条件でセレン酸の還元が可能であった。特に、KND-1 については好気条件での顕著なセレン酸還元が確認され、嫌気処理を必要としないセレン酸の除去・回収への活用が期待された。

Marine microbe, Selenate reduction, Selenium recovery

発表責任者：阪口利文（sakaguchi@pu-hiroshima.ac.jp）

講演番号：2J28a03
講演日時：3 月 18 日 09:50～ J 校舎 28 会場

ジスプロシウムを固化蓄積する好酸性真菌 *Penidiella* sp. T9 株の分離および特徴解析
A new fungal isolate, *Penidiella* sp. strain T9 is an effective dysprosium accumula-tor, incorporating dysprosium as dysprosium phosphate compounds

○堀池 巧[1]、清野 肇[2]、山下 光雄[1,2] ([1]芝浦工大, SIT 総研，レアメタルバイオリサーチセンター、[2]芝浦工大，工)
○Takumi Horiike[1], Hajime Kiyono[2], Mitsuo Yamashita[1,2] ([1]RMBC, Res. Org. Adv. Eng. SIT, Shibaura Inst. Tech., [2]Eng., Shibaura Inst. Tech.)

近年レアアース元素（REE）を用いた製品の需要が急増していることから，REE は産業にとって欠かせない元素の一つである。特にジスプロシウム（Dy）は次世代自動車や風力発電などのモーター用磁石に用いられるため，日本に限らず世界中で需要が増加している。また Dy 産出国の資源ナショナリズムなども影響して供給の不安定化が問題となっている。その一方で Dy を含む工業廃水や鉱山廃水は，Dy 資源としての潜在的ポテンシャルが高いにもかかわらず，既存の物理化学的処理では Dy を効率よく回収することが困難であるために放置されている。微生物による金属の蓄積（バイオアキュミレーション）は物理化学技術に比べ低コスト，低環境負荷，高効率であることから，新たな Dy 回収方法として注目されている。しかしながら，Dy は酸性鉱山廃水（pH3.0 以下）などの酸性環境に溶け込んでおり，このような極限環境条件下で Dy を蓄積する微生物は分離されていない。Dy などの REE を固化する微生物の研究例はいくつかあるが，実用化までには至っていないのが現状である。そこで本研究では低濃度 Dy 廃液からの Dy 回収技術を開発するため，酸性条件で増殖し Dy を高効率に蓄積する微生物を廃鉱山や工場廃棄物などの重金属を含む環境試料から分離することを試みた。また得られた分離株の分子生物学的解析および形態学的特徴から種を同定し，特徴付けを行った。さらに電子顕微鏡観察と化学状態解析により，Dy 蓄積部位の特定や Dy 固化物の化学構造の解明を試みた。

溶存 Dy を取り除く好酸性微生物 T9 株を廃鉱山試料から分離した。本株は Dy を含む酸性培地（pH2.5）を用いた 3 日間の培養で，溶存 Dy を 100 mg/L から 53 mg/L にまで減少させた。28S-D1/D2 rDNA 部分塩基配列と形態観察の結果から，T9 株を *Penidiella* sp. T9 株と命名した。電子顕微鏡-エネルギー分散型 X 線分析により T9 株細胞断面を解析したところ，本株は Dy を主に細胞表面に蓄積し細胞内にも微粒子として蓄積していた。細胞表面の Dy 層は Dy ナノ粒子の集合体（数百 nm）が凝集して構成されていた。X 線吸収微細構造解析による Dy の局所構造解析の結果から，細胞表面の Dy 固化物は $DyPO_4$ であると判明した。一方，X 線回折による結晶構造解析では明確なスペクトルが得られなかったことから，本株が生成した $DyPO_4$ は化学沈殿方法によって得られる結晶 $DyPO_4$ と異なるアモルファスであると示唆された。以上のことから，本株はリン酸を利用して Dy を固化蓄積していると考えられた。T9 株は酸性条件下で増殖し同時に Dy を蓄積する能力を持つことから酸性鉱山廃液などからの Dy 回収のための微生物触媒として期待される。

bioaccumulation, biomineralization, metal biotechnology

発表責任者：堀池　巧（i030589@shibaura-it.ac.jp）

講演番号：2J28a04
講演日時：3 月 18 日 10:05～ J 校舎 28 会場

# 沈水植物オオカナダモ（*Egeria densa*）のマンガン集積には付着微生物が関与している
# Mn-accumulation in a submerged plant *Egeria densa* is mediated by epiphytic bacteria

○原田 英美子、辻 康介、沢田 美由紀、長谷川 博（滋賀県大環境科学）
○Emiko HARADA, Kousuke TSUJI, Miyuki SAWADA, Hiroshi HASEGAWA (The Univ. of Shiga Pref.)

【緒言】重金属集積性の水生植物は、水圏の環境浄化（ファイトレメディエーション）や有用金属の回収（ファイトマイニング）に利用できる可能性がある。琵琶湖水圏で生育している水生植物オオカナダモ（*Egeria densa*）はマンガン（Mn）を高濃度に集積していた。3 年間の野外調査の結果では、オオカナダモの Mn の含有量は春先で高く、夏から秋に低下する季節変動をしており、Mn 蓄積の個体別最大蓄積量は 56,000 mg/kg であった。一方、実験室内で栽培したオオカナダモでは Mn の高集積が見られないことから、何らかの野外の環境要因が水生植物の Mn 集積に関与していることが考えられた。本研究では、葉表面の付着物および付着細菌がオオカナダモの Mn 集積に及ぼす影響について調査した。

【材料及び方法】
彦根市石寺町の集落環濠よりオオカナダモを採集し、植物体表面の観察および元素分析を行った。また、MnO 寒天培地上を用いて植物表面の付着細菌株の単離を行った。単離した細菌株を、Mn を添加した LB 液体培地で培養し、ゲノム DNA を抽出した。PCR 反応により 16SrRNA 配列を増幅させ、得られた配列を用いて種の判別を行った。

【結果】
野外で採集したオオカナダモの植物体表面を、VPSEM-EDX(variable-pressure SEM-energy dispersive X-ray analysis)装置を用いて直接観察したところ、Mn を含んだ付着物が存在することが確認された。また、呈色反応試薬ロイコベルベリンブルーにより、付着物に含まれているのは酸化型の Mn であることが明らかになった。オオカナダモ葉の表面から付着細菌の単離を行い、16S rRNA 配列の解析により、単一性が確認された株を 12 株得た。単離した細菌株による Mn 酸化物の生産を調べたところ、8 細菌株で酸化 Mn が検出された。この中には、既知の Mn 酸化細菌のグループには属さない、*Acidovorax*, *Comamonas*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* 属と判別される菌株が含まれていた。培養条件による Mn 酸化能の差を調べた結果、寒天平板培養時のみ Mn 酸化物の生産が確認された。細菌株はそれぞれ成長速度が大きく異なったが、高濃度の Mn を含む培地で生育することが確認された。これらの知見から、オオカナダモにおける Mn 集積には、葉表面の付着細菌による Mn 酸化物の生成が関連していると考えられた。Mn 酸化細菌は環境中の金属の動態に関与していることが知られているが、本研究により水生植物とも相互作用していることが明らかになった。

*Egeria densa*, epiphytic bacterium, manganese-oxidizing bacteria

発表責任者：原田英美子（harada.e@ses.usp.ac.jp）

講演番号：2J28a05
講演日時：3 月 18 日 10:20～ J 校舎 28 会場

地下環境褐炭由来の微生物群を用いた嫌気条件下での腐植物質分解
Anaerobic decomposition of humic substances by a bacterial consortium obtained from the subsurface lignite.
○上野 晃生[1]、玉村 修司[1]、荒牧 憲隆[1]、重吉 八郎[2]、福嶋 正巳[3]、長沼 毅[4]、金子 勝比古[1]([1]幌延地圏環境研究所、[2]三菱マテリアル株式会社、[3]北大院・工学研究院、[4]広島大院・生物圏科学)
○Akio UENO[1], Shuji TAMAMURA[1], Noritaka ARAMAKI[1], Hachiro SHIGEYOSHI[2], Masami FUKUSHIMA[3], Takeshi NAGANUMA[4], Katsuhiko KANEKO[1] ([1]H-RISE, [2]Mitsubishi Material Co. Ltd., [3]Hokkaido University, [4]Hiroshima University)

【研究背景】
地球生物圏の有機炭素プールを見た場合、地表(土壌含む)の全有機炭素量は $10^3$ Pg C (1 Pg＝$10^{15}$ g) のオーダーである一方、地下の全有機炭素量は $10^7$ Pg C のオーダーと量的にはるかに大きく[1)]、その大半は難分解性有機物である腐植物質として存在する[2)]。腐植物質は、好気な地表環境では白色腐朽菌や放線菌による分解が多く報告されているが[3-5)]、嫌気的な地下環境における腐植物質の分解に関する知見はきわめて乏しい。そこで我々は、嫌気条件下で腐植物質を分解する微生物の探索とその分解能に関する研究を行っている[6)]。本研究では、腐植物質の一画分であるフミン酸(humic acids; HA)を用い、HA が嫌気条件下で微生物によりどのような分解を受けるかを調べた。

【実験方法および結果】
昨年度の大会において、地下環境褐炭に由来する集積培養物「Sal-4」を得たことを報告した[7)]。本研究では、市販のフミン酸 Aldrich HA と、日本原子力研究開発機構・幌延深地層研究施設より採取した珪藻泥岩(声問層)より調製した声問層 HA を使用した[6,7)]。集積培養と同じ培養液(DSMZ 579 *Geobacter* 培地)を用い、Sal-4 を添加しない実験群(対照実験)と添加した実験群を設定し、Aldrich HA もしくは声問層 HA のいずれかを培養液に添加後、嫌気条件での培養を 30℃、28 日間行った。既報に従い培養液より HA を抽出後[6)]、高速サイズ排除クロマトグラフィー(HPSEC)、フーリエ変換赤外分光スペクトル(FT-IR)解析、熱分解-GC/MS(py-GC/MS)を行った。
HPSEC では双方の HA で分子質量の減少が確認され、Sal-4 により HA の嫌気条件下での分解が生じていることが分かった。FT-IR 解析では、Aldrich HA と声問層 HA では 1710 および 1200-1250$cm^{-1}$ 付近の、声問層 HA ではさらに 2930、1450、1040 $cm^{-1}$ 付近の吸収の消失が観察された。この結果、Aldrich HA ではカルボキシル基の部分が、声問層 HA では脂肪族性の炭化水素やカルボキシル基の部分、アルコールや多糖類に由来する部分が分解される可能性が示唆された、py-GC/MS により、Sal-4 を添加した実験群において、Aldrich HA 分子内の単環芳香族部分が分解されていることが分かった。
以上の結果から、嫌気条件下での Sal-4 によるフミン酸分解では、分子内のある特定の分子構造部分が分解され、フミン酸全体の構造が変化していることが考えられた。

【参考文献】[1)]Sundquist and Visser (2014) The Geologic History of the Carbon Cycle in Treatise on Geochemistry 2nd edn.; [2)]Stevenson (1994) Humus chemistry; [3)]Grinhut *et al.* (2011) Environ Sci Technol 45:2748-2754; [4)]Yanagi *et al.* (2008) Microbes Environ 23:44-48; [5)]Steffen *et al.* (2002) Appl Environ Microbiol 68:3442-3448; [6)]Ueno *et al.* (2016) Sci Rep 6:18990; [7)]2016 年度日本農芸化学会大会講演要旨集(発表番号:3A021)

humic substances, subsurface environment, lignite

発表責任者：上野　晃生（akio.ueno@h-rise.jp）

講演番号：2J28a06
講演日時：3 月 18 日 10:45～ J 校舎 28 会場

# 燻炭により生育が促進する微生物の探索と抗真菌活性の比較

Characterization of microbes with enhanced growth in the presence of rice husk biochar

○江邉 正平、大池 達矢、岡南 政宏、阿野 貴司（近大院生物理工）
○Shohei EBE, Tatsuya OHIKE, Masahiro OKANAMI, Takashi ANO (Grad. Sch. BOST, Kindai Univ.)

【目的】
イネの籾殻を焼成して得られる燻炭は、土壌へ施肥することで作物の生長促進をもたらすことが知られている。しかし、そのメカニズムの詳細はほとんど明らかにされていない。我々は土壌微生物と植物の関係に着目し、燻炭が土壌微生物の増殖・活性を促進することで間接的に植物生長に関わるのではないかと考えた。本研究では燻炭存在下において生育が促進される微生物を単離し、燻炭が植物生長を促進するメカニズムの解明を目的とした。

【方法】
燻炭存在下において生育が促進される微生物を得るため、環境中から微生物の単離を行った。得られた微生物を燻炭が添加された寒天培地にて培養を行い、燻炭非添加の培地における増殖面積との比較から燻炭存在下において増殖が促進される微生物の選抜を行った。続いて燻炭により生育が促進される微生物を液体培養における燻炭添加試験に供した。

【結果】
燻炭存在下において生育が促進される微生物の探索を行った結果、燻炭を添加した寒天培地上においてコロニーの増殖面積が燻炭非添加の培地と比較して拡大する微生物 IA 株と SA 株が得られた。得られた菌株を用いて燻炭を添加した寒天培地上での面積増加率を求めたところ SA 株より IA 株の方が高い値を示した。得られた IA 株と SA 株は *Bacillus* 属の細菌であり、ともに植物病原菌 *Rhizoctonia sorani* に対して抑制能を有することが示された。IA 株と SA 株をそれぞれ燻炭添加液体培地で培養したところ、どちらの菌株においても燻炭非添加の培地と比較した際の菌数が増加した。またその培養液を濾過滅菌した上清を用いて *R. solani* との抗真菌活性試験を行った結果、燻炭を添加しなかったものでは抑制が認められなかったのに対し、燻炭を添加したものでは強い抑制を示した。
本研究では燻炭存在下において増殖および抗生物質生産を促進する IA 株と SA 株が単離できた。このように燻炭は土壌に施肥されることで様々な微生物の活性促進作用を示し、結果として植物生長を促進することが考えられる。

rice husk biochar, *Bacillus*, bacterial growth enhancement

発表責任者：江邉正平（bd5002es@waka.kindai.ac.jp）

講演番号：2J28a07
講演日時：3 月 18 日 11:00～ J 校舎 28 会場

Phanerochaete chrysosporium における aldo-keto 還元酵素 AKR1
Characterization of an aldo-keto reductase, AKR1 in Phanerochaete chrysosporium
○井本 篤志[1]、栗山 和也[1]、阪本 鷹行[2]、左近 静香[3]、泉津 弘佑[1]、鈴木 一実[1]、入江 俊一[1]([1]滋県大環、[2]徳大生資、[3]京大生存)
○Atsushi Imoto[1], Kazuya Kuriyama[1], Takaiku Sakamoto[2], Shizuka Sakon[3], Kosuke Izumitsu[1], Kazumi Suzuki[1], Toshikazu Irie[1] ([1]Univ. of Shiga Pref., [2]Tokushima Univ., [3]Kyoto Univ.)

【背景】カルモデュリン（CaM）阻害剤 W-7 を白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* に添加することによりリグニンペルオキシダーゼ(LiP)およびマンガンペルオキシダーゼ（MnP）の発現が抑制されることが知られている。CaM は細胞内 $Ca^{2+}$の二次メッセンジャーであり、CaM の標的タンパク質のなかに LiP や MnP の発現に関与する因子が含まれていると考えられた。そこで、ファージディスプレイによる CaM 相互作用性タンパク質の検索を試みた。その結果、ピックアップした 205 個のクローン中 37 クローンが aldo-keto 還元酵素（AKR1;protein ID 3030943）遺伝子であり、検出された約 100 種の遺伝子のなかで最大の頻度だった。一般に aldo-keto 還元酵素はキシロース代謝や酸化ストレス応答に働くことが知られている。しかし、我々の知る限り、AKR1 以外に CaM 結合性が認められたものは存在しない。本研究は AKR1 の酵素化学的な性質とフィードバック的に LiP や MnP の発現に影響を及ぼす可能性について検討することを目的とした。

【方法・結果】大腸菌を宿主として GST タグ付き組換えタンパク（AKR1-GST）を作成し、プルダウン法に供したところ、$Ca^{2+}$依存的な CaM 結合性が再確認された。次に His タグ付組換えタンパク（AKR1-His）を作成し、これを以降の実験に用いた。SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供したところ、還元剤を添加した状態では予想通りの約 35 kDa の位置にバンドが確認できたが、非還元の状態では約 55 kDa であった。二量体を形成していると考えられる。グリセルアルデヒドを基質とした酵素活性を $Ca^{2+}$存在下において測定したところ、CaM を添加した場合は無添加の場合よりも活性が増加し、*Vmax* 値は約 1.69 倍、*Km* 値は約 0.31 倍となった。キシロースを基質として用いた場合も同様の傾向で、CaM を添加した場合は無添加の場合よりも *Vmax* 値は約 1.67 倍、*Km* 値は、約 0.66 倍となった。以上のことから、CaM が結合することにより、AKR1 における基質との親和性や最大反応速度が上昇し、細胞内に取り込まれたキシロースの代謝や酸化的リグニン分解の際に発生するカルボニル化合物の無毒化を行う能力が向上することが推定される。現在、*AKR1* 遺伝子を *Saccharomyces cerevisiae* で過剰発現させ、バニリンや酸化ストレスに対する抵抗性の変化を調べているところである。

white-rot fungi, lignin-modifying enzyme, aldo-keto reductase

発表責任者：入江俊一（tirie@ses.usp.ac.jp）

講演番号：2J28a08
講演日時：3 月 18 日 11:15～ J 校舎 28 会場

# 放射能汚染牛の好気性高温発酵処理堆肥を用いたイネ科植物の栽培

# The cultivation of grass using high temperature aerobic compost which treated dead bodies of radioactive cattle

○吉井 貴宏、矢野 紘子、古井 義博、森屋 利幸、大島 泰郎（共和化工・環境微生物研）
○Takahiro Yoshii, Hiroko Yano, Yoshihiro Furui, Toshiyuki Moriya, Tairo Oshima (Inst. of Environ. Microbiol., Kyowa Kako Co., Ltd)

【目的】堆肥化は焼却のような複雑で高額な設備がなくとも有機性廃棄物を処理することができ、かつ処理物を肥料として再利用できる等、環境負荷が小さく省コストな廃棄物処理技術である。近年、開発された好気性高温堆肥発酵は従来の堆肥発酵よりも内部の温度が高温（90℃以上）で発酵が進行するため、有機物の分解が非常に速く、かつ放射性物質の飛散や極度な濃縮といった心配がないことから、福島第一原発事故で拡散した放射性核種に汚染された家畜等の死体や牧草などの処理への活用が期待されている。しかしながら、処理物を肥料として使用した時の植物の経根吸収について検証した事例は多くない。宮城県栗原市では 2016 年 5 月から汚染牧草の減量減容化実証試験を実施しており、300 Bq/kg 以下の処理物を使った栽培試験では植物への移行がないことが確認されている。そこで我々は、北里大学獣医学部が中心となって実施した放射能汚染牛の調査研究 [1]において得られた、牛の解剖残渣の好気性高温堆肥発酵処理物（3440 Bq/kg）を用いて栽培試験を行い、前回大会 [2]においてコマツナやジャガイモでは僅かに放射性 Cs が検出されたが、ほとんど経根吸収されなかったことを報告した。今回は植物種を変更し、イネ科植物や果菜類、根菜類について、同様の栽培試験を行い、放射性 Cs の移行について検証した。

【方法】農作物栽培試験はプランターにてイネ科植物としてコシヒカリとイタリアンライグラス、果菜類としてインゲンとミニトマト、根菜類としてダイコンおよびニンジンを栽培した。基本土壌は市販の黒土と赤玉土を 1：1 で混合した。処理物の施用量は基本土壌の 50%（重量比）とし、栽培土壌および各作物体の放射性 Cs 濃度を分析した。また、土壌の交換性カリウムおよびアンモニア態窒素量について分析した。

【結果および考察】牛残渣処理物を用いた栽培土壌中の放射性 Cs は約 1400 Bq/kg であり、交換性カリウムは約 6,000 mg/kg であった。栽培した植物のうち、イネの穂および藁、牧草の葉茎からごく僅かではあるが放射性 Cs が検出された（それぞれ 13.7、14.0 および 11.5 Bq/kg）。一方、果菜類や根菜類は 10 Bq/kg 以下であった。牛残渣処理物の放射性 Cs は、土壌中で不溶態となり、経根吸収により植物へ移行する割合が極めて低いと結論付けた。

1) 日本獣医師会雑誌 65(9), 645-652, 2012-09-20
2) 日本農芸化学会 2016 年度大会(札幌), 3A-018

radioactive cesium, compost, cultivation of crops

発表責任者：吉井　貴宏（takahiro.yoshii@kyowa-kako.co.jp）

講演番号：2J28a09
講演日時：3 月 18 日 11:30～ J 校舎 28 会場

Value added cocompost of oil palm harbored with multifunctional bacteria beneficial to industry

○Clament CHIN[1], Yoshihide FURUYA[1], Yukihiro TASHIRO[1], Yoshihito SHIRAI[2], Mohd. Huzairi MOHD. ZAINUDIN[3], Nurhayati RAMLI[3], Mohd. Ali HASSAN[3], Kenji SAKAI[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Kyushu Instit. Technol., [3]Univ. Putra Malaysia)

Oil palm (*Elaeis guineensis*) is an important crop in Malaysia and total land used for plantation has exceeded one million hectare in the country. This perennial crop yields its oil seed in fruit bunches throughout the year and several types of biomass and liquid wastes are generated from the downstream processing of palm oil. In recent years, a new and improved cocomposting production system with zero-discharge of waste has been achieved under the collaboration between Japanese and Malaysian scientists in the SATREPS research program. To accelerate this system, in this study, we are aiming to evaluate the potential of cocompost via screening indigenously functional bacteria. The following three main functioning groups were screened using *in vitro* methods: (1) plant growth promotion (PGP) traits (N-fixation, P, K & Si-solubilization, and indole-3-acetic acid, $NH_4$ & siderophore production), lignocellulosic biomass degradation potential (xylanase and carboxymethyl cellulose activities), and protection against *Ganoderma boninense* known as a pathogen for oil palm. As the results, 100 strains were screened from the cocompost, and 25 isolate strains with interesting multi-functional traits were selected and identified via 16S rRNA gene sequence analysis. BLAST search revealed five bacterial genera from two phyla, and there were *Bacillus* and *Paenibacillus* (Firmicutes), as well as *Citrobacter*, *Enterobacter* and *Kosakonia* (Proteobacteria). Nine isolate strains were found to express cross section activities between two functioning groups. There were *Bacillus* sp. TSASi1 and *Enterobacter* sp. B3 (promotion and protection), *Bacillus* sp. CESi13, *Bacillus* sp. TSASi15 and *Citrobacter* sp. CESi7 and TSASi10 (promotion and degradation), and *Bacillus* sp. CE4, *Bacillus* sp. P4 and *Kosakonia* sp. CESi3 (protection and degradation). We further selected 11 isolate strains for *in vivo* cultivation test on Komatsuna growth in pots experiments in an attempt to validify the plant growth promotion activity. Two genera *Citrobacter* and *Enterobacter* were found to significantly promote leaf growth (length, width, and number) and are likely to act as PGPB in the cocompost fertilizer. We believe that these results in this study would catalyze the adoption of cocomposting system with zero discharge by the oil palm industry in Malaysia in near future. The new system not only could solve some of the environmental pollution issues, yet simultaneously produce a kind of value added cocompost beneficial to the oil palm industry.

plant growth promoting bacteria, biomass degradation, anti-phytopathogenic fungi

発表責任者：Kenji Sakai（kensak@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：2J28a10
講演日時：3 月 18 日 11:45～ J 校舎 28 会場

# 美容素材としてのオリーヴ樹皮の可能性について

Characterization of Olive Tree Bark

○岸本 憲人（小豆島ヘルシーランド株式会社オリーヴ健康科学研究所）
○ Norihito KISHIMOTO (Central Institute of Olive and Health Sciences, Shodoshima Healthyland Co., Ltd.)

【目的】オリーヴの果実は健康や美容に優れた成分を含んでおり、近年の健康志向の高まりからオリーヴオイルの需要は年々増加している。オリーヴオイルは食用のみならず、スキンケア・美容用としても注目を集めている。当社では、自社農園で栽培したオリーヴから食用・美容オリーヴオイルを製造するだけでなく、搾油後の果実搾りかす、葉、枝などの未利用資源の健康・美容素材への転換も試みている。既に、果実搾りかすから抽出したエキスを配合した化粧水の開発に成功している。本研究では、オリーヴの樹皮に着目し、美容素材への転換を試みた。本発表では美容素材としてオリーヴ樹皮の可能性について報告する。
【方法】オリーヴの樹皮から溶媒を用いてエキス（以下、オリーヴ樹皮エキス）を抽出し、オリーヴ樹皮エキスの美容機能性について調べた。
【結果及び考察】まず、オリーヴ樹皮エキスは高濃度のポリフェノールを含んでいることから抗酸化作用を調べたところ、高い ORAC(Oxygen Radical Absorbance Capacity, 活性酸素吸収能力)値を示した。次に、オリーヴ樹皮エキスに紫外線(UV)吸収能を調べたところ、UV-A 波及び UV-B 波に相当する波長領域において高い吸収効果が認められた。実際に、オリーヴ樹皮エキスに UV ストレス回避効果があることがわかった。さらに、オリーヴ樹皮エキスに線維芽細胞賦活作用やメラニン産生抑制作用などの美容効果についても認められた。以上の結果から、オリーヴ樹皮エキスは、肌の抗酸化や抗老化、肌細胞の代謝促進などの美容機能を有していることから、美容素材として期待できることがわかった。

Olive, Tree bark, Cosmetics

講演番号：2J28p01
講演日時：3 月 18 日 14:00～ J 校舎 28 会場

# 「大気窒素」を活用する次世代型発酵：窒素固定細菌による「廃グリセロール」の再資源化

# Nitrogen-utilizing next generation fermentation: Recycling of "waste glycerol" by a nitrogen-fixing bacterium

○吉田 暢広[1]、菅原 良実[2]、南部 優子[3]、村田 幸作[4]、橋本 渉[1,3]（[1]京大・農、[2]京都市・環境政策局、[3]京大院・農、[4]摂南大・理工）
○Nobuhiro YOSHIDA[1], Yoshimi SUGAHARA[2], Yuko NAMBU[3], Kousaku MURATA[4], Wataru HASHIMOTO[1,3] ([1]Fac. Agric., Kyoto Univ., [2]Bureau Env. Policy, Kyoto City, [3]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [4]Fac. Sci. Eng., Setsunan Univ.)

【背景と目的】低炭素社会の実現に向けて、欧州を中心に植物油からバイオディーゼル燃料（BDF）が製造されている。日本においても、廃食油からアルカリ触媒法により BDF が生産されており、その生産量は年々増加している。京都市は全国に先駆けて BDF を製造し、市バスやゴミ収集車の燃料に用いており、二酸化炭素の排出削減に貢献している。しかし、BDF 製造の際に原料油脂の 10～20%程度のグリセロールが生じる。この副生する「廃グリセロール」（グリセロール：約 50%）は、アルカリ性で、油分やメタノールなどの不純物を含むため、その利活用が進んでおらず、再資源化が求められている。当研究室では、窒素固定細菌 *Azotobacter vinelandii* を用いて、窒素源を新たに添加せず、「大気窒素」を積極的に活用する次世代型発酵技術の開発に取り組んでおり、これまでに試薬の「純グリセロール」から有用ポリマー［アルギン酸（増粘剤）とポリヒドロキシ酪酸（生分解性プラスチック素材）］を生産している。今回は、窒素固定細菌による「廃グリセロール」の再資源化を目指した。
【方法と結果】「廃グリセロール」がアルカリ性（pH 9.3）を示すため、*A. vinelandii* の生育 pH を調べた。リン酸緩衝液を用いて、「純グリセロール」と窒素源を含まない無機塩からなる最少培地で本菌を生育させたところ、pH 9 以上でも良好に生育することがわかった。そこで、「廃グリセロール」を水道水で希釈した溶液（グリセロール：0.2%）で培養したところ、本菌の生育が確認できた。さらに、微量のミネラルを添加することにより、その生育が促進された（培養開始 $10^3$→培養 3 日目 $10^7$ cells/ml）。走査型電子顕微鏡で観察したところ、「廃グリセロール」と「純グリセロール」培養菌体との間で、細胞表層構造に変化は認められず、「廃グリセロール」でも良好に生育していることがわかった。そこで、生育に伴うグリセロールとアルギン酸の濃度変化を測定した。グリセロールは酵素法で、アルギン酸は硫酸カルバゾール法でそれぞれ定量した結果、培養 2 日目でグリセロールをほぼ完全に消費し、培養 3 日目当たりからアルギン酸の分泌が確認された。実際に、「廃グリセロール」無機塩最少寒天培地で生育させたところ、本菌は高いムコイド性を示した。
【考察】「廃グリセロール」培地にはほとんど窒素成分が含まれていないため、窒素固定細菌 *A. vinelandii* は「廃グリセロール」を炭素源として、「大気窒素」を窒素源として生育することが示唆される。本菌が、前処理せずに直接水道水で希釈した「廃グリセロール」を資化し、有用ポリマーを生産することから、「大気窒素」を活用する省エネ・省コスト型「廃グリセロール」再資源化技術の開発が可能であることが明らかになった。

*Azotobacter*, Biodiesel fuel, Waste glycerol

発表責任者：橋本渉（whasimot@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2J28p02
講演日時：3 月 18 日 14:15～ J 校舎 28 会場

# 有機質資材の無機化定量技術の構築

Construction of evaluation method for biomass mineralization

○奥田 秀樹、荒木 希和子、久保 幹（立命大・生命）
○Hideki OKUDA, Kiwako S. ARAKI, Motoki KUBO (Ritsumeikan Univ.)

【背景・目的】 自然環境中に存在する有機化合物は動植物の分泌物や死骸など様々なものに由来する。これら有機化合物は土壌中で主に微生物によって徐々に無機化合物へと分解される。この有機化合物が無機化合物へと分解される過程を無機化という。土壌に供給された無機化合物は、植物の成長や微生物の代謝などに用いられる。そのため、有機化合物の無機化は植物や微生物の生産や生育にとって非常に重要である。

農業に用いられる有機資材や堆肥には、生物由来の有機化合物が含まれる。したがって、有機資材や堆肥の種類や製品により構成する成分が異なっているため、微生物による分解率や土壌に供給できる無機化合物も大きく異なっている。これらは目的や用途によって使い分けされているが、有機資材や堆肥の土壌に対する投入量や分解に関する知見が乏しい。また、農業従事者の経験や勘に基づいて使用されるため、農作物の生産性が安定しない。有機資材や堆肥を適切に利用するためには、有機資材及び堆肥が、土壌中でどのように分解（無機化）されるかについて知見を得る必要がある。そのためには、有機資材や堆肥の無機化の指標およびその定量技術が必要である。

そこで環境中に広く存在し、様々な分解酵素を生産する微生物の *Bacillus* 属細菌に着目した。本研究では *Bacillus* 属細菌の有機化合物の分解力を利用し、有機資材及び堆肥の無機化の指標及び定量する技術を確立する。そして、様々な有機資材や堆肥の無機化の相対的速度を評価することを目的とした。

【方法・結果】 *Bacillus subtilis* (natto) TAKAHASHI を LB 液体培地で振盪培養（37℃、150 rpm）し、血球計算盤を用いて菌数を測定した。滅菌した有機資材または堆肥 0.25 g に滅菌水 5 ml と培養液 50 µl をそれぞれ加え、振盪培養（37℃、150 rpm、24 h）した。培養後、血球計算盤を用いて上清中の菌数を測定した。有機資材及び堆肥の分解による菌の増加数を無機化の指標の一つとした。

TAKAHASHI 株の増加数は、加えた有機資材及び堆肥によってそれぞれ異なった。菌数は、発酵資材である堆肥よりも、未発酵資材である有機資材を加えたときにより増加した。有機資材の中では、魚粉末で菌の増加数が最も多く、木質チップで最も増加数が少なかった。堆肥では、鶏糞堆肥で菌の増加数が最も多く、バーク堆肥で最も増加数が少なかった。したがって、有機質資材に *Bacillus* 属細菌を添加して培養した時の増加数が無機化の指標となることが検証できた。そして、植物由来より動物由来の有機質資材で菌による無機化速度が早いことが明らかになった。

decomposition, soil bacteria, organic material

発表責任者：久保幹（kubo@sk.ritsumei.ac.jp）

講演番号：2J28p03
講演日時：3 月 18 日 14:30～ J 校舎 28 会場

ユーグレナのワックスエステル発酵において溶存無機炭素が担う役割の解明
Clarification of the role of the dissolved inorganic carbon to drive wax ester fermentation in *Euglena*

Padermshoke Adchara[1]、○小川 拓水[1]、西尾 和樹[1]、中澤 昌美[1]、中本 雅俊[1,2]、岡澤 敦司[1]、金谷 重彦[2]、有田 正規[3,4]、太田 大策[1]（[1]阪府大院・生命環境、[2]奈良先端大院・情報、[3]遺伝研・生命情報、[4]理研・環境資源）
Adchara Padermshoke[1], ○Takumi Ogawa[1], Kazuki Nishio[1], Masami Nakazawa[1], Masatoshi Nakamoto[1,2], Atsushi Okazawa[1], Shigehiko Kanaya[2], Masanori Arita[3,4], Daisaku Ohta[1] ([1]Osaka Pref. Univ., [2]NAIST, [3]NIG, [4]RIKEN CSRS)

ユーグレナは，好気条件下では余剰の光合成産物を貯蔵多糖（β−1, 3−グルカン，パラミロン）として細胞内に蓄積し，嫌気条件下ではパラミロンを主要な炭素源として，解糖系とミトコンドリア内に存在する特殊な脂肪酸合成経路によってワックスエステル（WE）を産生し，細胞内に多量に蓄積する（WE 発酵）．ユーグレナが産生する WE は工業原料としての利用価値が高いことから，WE 発酵能の強化・改変を目的とした研究が精力的に進められている．しかし，WE 発酵の誘導機構については不明な点が多い．

我々は，WE 産生量の最大化を目指した培養条件の検討中，明／無酸素条件下において，培地中の無機炭素非存在下では WE 発酵が完全に停止すること，このとき無機炭素（$NaHCO_3$ または $CO_2$）の添加によって WE 発酵が再起動することを見出した [1]. この結果は, 培地中の無機炭素が WE 発酵において必須の役割を担うことを示している．次に，WE 発酵において無機炭素が担う役割について手掛かりを得るために，安定同位体（$^{13}C$）標識した重炭酸ナトリウム（$NaH^{13}CO_3$）を培地に添加して WE 発酵を誘導し，誘導開始から 24 時間後に細胞内に蓄積した WE 分子の安定同位体標識状況を GC-MS を用いて解析した．その結果，偶数鎖と比較して奇数鎖の脂肪酸残基における安定同位体標識率が高いことが分かった [1]．したがって，培地中の無機炭素が奇数鎖脂肪酸の生合成経路に特徴的な酵素反応によって固定され WE 産生に直接利用される可能性が考えられた．

この可能性を検証するために，無機炭素の固定に関わる酵素の候補であるホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ（PEPCK）の阻害実験を行った．PEPCK 阻害剤（3-メルカプトピコリン酸; 3MPA）存在下と非存在下で，安定同位体（$^{13}C$）標識した二酸化炭素（$^{13}CO_2$）を添加して WE 発酵を誘導し，TCA 回路を構成する有機酸の蓄積量および標識状況の経時変化（1 時間以内）を試験区間で比較した．その結果，培地中の標識無機炭素の有機酸への取り込みが 3MPA 存在下では部分的に抑制されることが分かった [1]．このことから，WE 発酵の誘導初期には，培地中の無機炭素が 3MPA に感受性を示すタイプの PEPCK によって固定される可能性が示唆された．一方，有機酸の解析結果からは，3MPA に感受性を示さないタイプの PEPCK，あるいは PEPCK とは異なる無機炭素固定経路が存在する可能性も示唆された．

[1] Padermshoke et al., *PLoS ONE*, 2016, 11, e0162827.

environmental carbon dioxide fixation, *Euglena*, wax ester fermentation

発表責任者：太田大策（ohtad2g30490@bioinfo.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：2J28p04
講演日時：3 月 18 日 14:45～ J 校舎 28 会場

バイオ燃料生産に向けた耐塩性緑藻の進化工学的育種と塩ストレス耐性による油脂生産低下メカニズムの解明

Evolutionary Breeding of the Microalga *Chlamydomonas* sp. Strains Resistant to High-Salinity and Evaluation of Their Lipid Productivity

○加藤 悠一[1]、賀 詩欣[2]、張 嘉修[3]、蓮沼 誠久[1]、近藤 昭彦[1] ([1]神戸大、[2]ハルビン工業大、[3]国立成功大)

○Yuichi KATO[1], Shih-Hsin HO[2], Jo-Shu CHANG[3], Tomohisa HASUNUMA[1], Akihiko KONDO[1] ([1]Kobe Univ., [2]Harbin Inst. Technol., [3]National Cheng Kung Univ.)

再生可能エネルギーのひとつとして、光合成生物を利用して生産するバイオ燃料が期待されている。微細藻類は、単位面積当たりのバイオマス生産量が高く、バイオ燃料の生産者として極めて有望である。従来、淡水産の燃料生産藻が数多く単離されてきたが、淡水資源の枯渇を回避し、豊富に存在する海水を有効利用することを考慮すると、耐塩性は微細藻類バイオ燃料生産における重要な因子である。また塩濃度の高い条件で培養することで、屋外培養において不可避な外来生物コンタミネーションの影響を抑制することも期待できる。我々はこれまで汽水性緑藻 *Chlamydomonas* sp. JSC4 に着目し、屋外大量培養に向けた油脂生産技術の開発を行ってきた。JSC4 株が塩存在下で高い油脂生産能を発揮することを見出し、高いバイオマス生産量(6 g/L)と油脂含有率(50%)を両立に成功した。また、油脂生産メカニズムの解明を目指して網羅的代謝解析を実施し、JSC4 株が塩存在下でデンプンを分解して油脂に変換することを解明した。その一方で、塩存在下では生育が阻害され、塩非存在下よりもバイオマス生産性が低下することが課題として浮上した。

本研究では、進化工学的アプローチにより JSC4 株をもとに高い耐塩性を有する株を育種し、塩存在下での生産性を向上させることを目的とした。(1)野生株を自然突然変異のみで育種、(2)重粒子線照射により準備したランダム突然変異集団を高塩濃度での選別と自然突然変異の両方で育種、の２つの戦略を用い、高塩濃度環境(塩濃度 5%もしくは 7%)で最長 1 年間にわたり継続的に培養を行った。結果、野生株が生育できない塩濃度 7%においても生育可能な耐塩性株を獲得することに成功した。獲得した耐塩性株では、塩ストレスに対する防御応答である細胞凝集(パルメロイド形成)が緩和されていた。しかし、塩存在下での耐塩性株の油脂含有率は野生株よりも低く、油脂生産時に分解されるデンプンの含有率は野生株よりも高かった。耐塩性株における油脂含有率低下メカニズムを解明するため、油脂生産に関係する遺伝子の網羅的発現解析を実施した。野生株では塩存在下において油脂合成に寄与する遺伝子やデンプン分解に寄与する遺伝子の発現が誘導される。しかし耐塩性株では、塩存在下でのこれらの遺伝子の発現誘導が見られなかった。

本研究では、7%もの高塩濃度に耐えうる耐塩性株の育種に成功し、高塩濃度環境での安定的な培養を可能にした。また、油脂生産が塩ストレス応答の一部であり、塩ストレス状態が油脂生産に必要であることを解明した。たとえ塩存在下であっても、塩ストレス状態が緩和されると油脂生産が誘導されないことを見出した。

Evolutionary Breeding, Microalgae Biofuel, Salinity stress

講演番号：2J28p05
講演日時：3 月 18 日 15:00～ J 校舎 28 会場

# 緑藻 *Boryococcus braunii* のトリテルペン炭化水素合成酵素の出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いた機能解析

# Functional analysis of triterpene biosynthetic enzymes of the green alga *Botryococcus braunii* by using the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

○池田 美咲[1]、三井 菜々香[1]、竹田 綾女[1]、野口 哲子[1]、岡田 茂[2]、鍵和田 聡[1] ([1]奈女大理、[2]東大農)
○Misaki IKEDA[1], Nanaka MITSUI[1], Ayame TAKEDA[1], Tetsuko NOGUCHI[1], Shigeru OKADA[2], Satoshi KAGIWADA[1] ([1]Nara Women's Univ., [2]Univ. of Tokyo)

【背景・目的】

単細胞緑藻 *Botryococcus braunii* は大量の炭化水素を生産し、細胞外に蓄積する。特にこの緑藻の B 品種が生産するトリテルペン botryococcene は軽質化によるバイオ燃料としての利用が期待されている。botryococcene 合成に関与する酵素として、スクアレン合成酵素と相同性のある二つの酵素 Squqlene Synthase-Like protein 1 (*SSL-1*) および *SSL-3* が同定され、まず *SSL-1* がファルネシル二リン酸 (farnesyl pyrophosphate (FPP)) からプレスクアレン二リン酸(presqualene pyrophosphate (PSPP))を、つぎに *SSL-3* が PSPP から botryococcene を合成するというユニークな反応機構が明らかにされた。我々は、トリテルペン類炭化水素の効率的な合成系の確立を目指して、分子生物学的操作が容易な出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に *SSL-1* と *SSL-3* を導入し、それらの機能を調べた。

【結果】

まず、*SSL-1* と *SSL-3* を脂質生産に関連する遺伝子変異をもたない標準株 YPH500 のゲノム DNA に導入し、botryococcene を生産できることを確認した。次に、基質である FPP 量を増やすために FPP 合成経路の上流に位置する HMG CoA 還元酵素遺伝子(*HMG1*)を構成的に発現する TEF プロモーターに、さらに FPP の消費を抑えるためにスクアレン合成酵素遺伝子(*ERG9*)のプロモーターをメチオニンで抑制可能な MET3 プロモーターに、それぞれ置換した。これらの改変により、合成選択培地を用いることなく酵母での安定的な botryococcene 生産が可能となった。

興味深いことに *SSL-3* は酵母内では単独で botryococcene を合成でき、*SSL-3* を 2 コピーもつ酵母は *SSL-1* および *SSL-3* をそれぞれ 1 コピーずつ酵母と同等のボトリオコッセンを合成できることがわかった。局在を調べると、*SSL-3* は膜貫通領域をもたないにもかかわらず酵母の小胞体膜へターゲティングでき、安定なターゲティングには C 末端部分の領域が必要なことがわかった。

【考察】

*SSL-3* 単独で botryococcene が合成できることは、酵素工学的な機能改変を行う際に、*SSL-3* だけを対象にできることを意味する。また *SSL-3* が酵母内で FPP と PSPP のいずれを基質にしているかは不明であるが、その機構の解明は酵素化学的に興味深いものである。効率的な膜へのターゲティングが翻訳後修飾により調節されている可能性もあり、修飾を調節することにより、酵母のみならず緑藻での炭化水素生産量の上昇を見込める可能性もある。

Botryococcus braunii, Triterpene, Saccharomyces cerevisiae

講演番号：2J28p06
講演日時：3 月 18 日 15:25～ J 校舎 28 会場

*Clostridium cellulovorans* および *Clostridium beijerinckii* 共培養によるシュガービートパルプからの酪酸生産

Butyric acid production from sugar beet pulp co-cultured by *Clostridium cellulovorans* and *Clostridium beijerinckii*

○富田 寿男[1]、川出 雄二郎[1]、岡﨑 文美[1]、Lopez-Contreras Ana M.[2]、田丸 浩[1,3,4] ([1]三重大院・生物資源、[2]Wageningen UR・Food Biobased Res.、[3]三重大・生命支セ、[4]三重大・新産業)

○Hisao TOMITA[1], Yujiro KAWADE[1], Fumiyoshi OKAZAKI[1], Ana M. Lopez-Contreras[2], Yutaka TAMARU[1,3,4] ([1]Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ., [2]Food Biobased Res., Wageningen UR, [3]Life Sci. Res. Center, Mie Univ., [4]Ind. Technol. Innov. Inst., Mie Univ.)

【背景と目的】サトウキビやトウモロコシといった原料からのバイオエタノール生産は実用化されているが，地球規模でのさらなる人口増加の問題から非可食性バイオマスの利用促進が急務となっている．また，その実用化には非可食性バイオマスが安定して入手可能であることが重要となる．テンサイは糖生産の主要原料であり，世界各国で栽培されている．糖搾汁後の絞り粕であるシュガービートパルプ（SBP）が，テンサイ 1 トン当たり約 500kg（湿重量）の副産物として得られる．テンサイの生産量から推計し，世界で年間 1 億トン以上の SBP が非可食性バイオマスとして入手可能である．加えて，テンサイは冷涼な気候を望むことから，国内では北海道，また海外ではアメリカ，フランス，ロシア，ドイツといった人口集中地域で盛んに生産されている．本研究では，*Clostridium cellulovorans* と *C. beijerinckii* の共培養によって，SBP からの酪酸生産における Consolidated Bioprocessing（CBP）を試みた．

【材料と方法】1，2，5 %(w/v)の SBP を含む液体培地に，*C. cellulovorans* 743B 株(ATCC35296)および *C. beijerinckii* NCIMB8052 株(ATCC51743)を植菌し，37℃で静置培養した．継時的に培養液をサンプリングし，OD600nm および pH を測定し，HPLC にて糖類，有機酸類，アルコール類の各濃度を定量した．

【結果と考察】*C. cellulovorans* 単一培養において，SBP を分解し，セロビオースおよびアラビノースを培養液中に蓄積した．*C. cellulovorans* と *C. beijerinckii* の共培養において，培地中に遊離したこれらの糖を *C. beijerinckii* が資化・増殖し，酪酸を生産したことが示唆された．これらのことから，糖化能力に優れた *C. cellulovorans* と発酵能力に優れた *C. beijerinckii* の共培養系が，SBP からの酪酸の一貫生産に適していると考えられた．

*Clostridium* spp., Sugar beet pulp, Consolidated bioprocessing (CBP)

発表責任者：田丸浩（ytamaru@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：2J28p07
講演日時：3 月 18 日 15:40～ J 校舎 28 会場

# *Ruminiclostridium josui* の RjCel5B または RjXyn10C と全長骨格タンパク質との複合体形成と活性の比較

# Recombinant cellulolytic or xylanolytic complex comprising the full-length scaffolding protein RjCipA and cellulase RjCel5B or xylanase RjXyn10C of *Ruminiclostridium josui*

○織田 拓、粟冠 真紀子、木村 哲哉、粟冠 和郎（三重大学)
○Taku Orita, Makiko Sakka, Tetsuya Kimura, Kazuo Sakka (Mie Univ.)

*Ruminiclostridium josui* はセルラーゼ複合体であるセルロソームを生成する中温性の嫌気性細菌である。*R. josui* のセルロソーム骨格タンパク質である CipA はファミリー３の糖質結合モジュール(CBM3)と 6 つのコヘシンから構成されており、CipA のコヘシンと触媒サブユニットのドックリンとの相互作用により、様々なバイオマス分解酵素を含む複合体を形成することが知られている。また、セルロソーム中では、様々な酵素が近接して存在することにより酵素活性に相乗的な増加が見られる現象が知られており、これを近接効果と呼ぶ。

今回、*R. josui* のゲノム情報を基にセルラーゼ RjCel5B とキシラナーゼ RjXyn10C 他、RjCipA の全長を発現させることに成功した。RjCel5B は CBM を持たず、大麦 β-グルカン に高い活性を示し、ヘミセルロースには全く活性を示さなかった。また、RjXyn10C はファミリー６の CBM を含み小麦アラビノキシランに高い活性を示したがセルロースには活性を示さなかった。

セルラーゼである RjCel5B と RjCipA の複合体、およびキシラナーゼである RjXyn10C と RjCipA の複合体をそれぞれ 6:1、6:3、6:6 のモル比で作成した。そして各モル比の複合体を用いて、稲わら粉末に対する分解活性を測定したところ、RjCel5B と RjCipA の複合体では、割合が 6:1、6:3、6:6 と骨格タンパク質の割合を高めるにつれ活性が増加し、複合体でない RjCel5B 単独の活性と比較するとそれぞれ、3.9 倍、5.6 倍、11.5 倍となった。RjCel5B は CBM を持っておらず、また RjCipA には結晶性セルロースに結合する CBM3 が含まれているため、複合体を形成することで不溶性セルロースへの結合が可能となり、酵素活性が増加したと考えられる。また、6:1 複合体の活性は 6:6 複合体の活性よりも低かったことから、セルロソーム形成による酵素の近接効果はないと思われる。

一方、RjXyn10C と RjCipA の複合体では 6:1、6:3、6:6 の稲わら粉末への酵素活性は、RjXyn10C 単独での活性と比較すると、それぞれ 0.28 倍、0.83 倍、1.20 倍となった。この結果は、RjXyn10C に含まれる主にヘミセルロースに結合する性質をもつ CBM6 と RjCipA に含まれる結晶性セルロースに結合する CBM3 の標的基質の違い及びそれらの結合力の違いが負のターゲッティング効果を生じさせたことを示唆している。RjXyn10C については、負のターゲッティング効果が大きく、近接効果については判断できない。近接効果については、CBM3 を除去した CipA を用いて検討する予定である。

cellulase, cellulosome, xylanase

講演番号：2J28p08
講演日時：3 月 18 日 15:55～ J 校舎 28 会場

# Adsorption and desorption of carbohydrate-binding modules in Trichoderma Reesei Cel7A

○Xu FANG, Baojie Jiang, Dan Feng, Suhao Niu (Shandong Univ.)

Cellobiohydrolase I (Cel7A) from *Trichoderma Reesei* consist of catalytic domain (CD) and carbohydrate-binding module (CBM) as well as linker which linked the two parts together, and then CBM recognizes and adsorbs on cellulose. However, during enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass, CBM also binds lignin non-productively. Thus, it is important to decrease the adsorption of CBMs onto lignin for increasing the cellulases hydrolysis efficiency.

We fused green-florescent protein (GFP), CBM of Cel7A with linker of CBHI from *Trichoderma reesei*. The fused protein was named GLC (GFP linked CBM). We prepared the variants of GLC with saturation mutagenesis. We found that the adsorption of GLC onto AICS-lignin (Acid Insoluble Corn Stover Lignin) was decreased as the negative charge of GLC increased. Furthermore, we proved the hydrolysis efficiency of CBHI's variant was higher than that of CBHI when microcellulose was mixed with AICSL.

lignocelluloses, cellulase, lignin

発表責任者：Xu Fang（fangxu@sdu.edu.cn）

講演番号：2J28p09
講演日時：3 月 18 日 16:10～ J 校舎 28 会場

*Schizophyllum commune* 変異株を用いた糖化発酵同時進行によるリグノセルロースからの直接 L-リンゴ酸生産

Direct Production of L-Malic Acid from Lignocellulose by Consolidated Bioprocessing with *Schizophhyllum commume* Mutant

○星野 一宏[1]、高野 真希[1]、畑下 昌範[2] ([1]富大理工、[2]若狭エネ研)
○Kazuhiro Hoshino[1], Maki Takano[1], Masanori Hatashita[2] ([1]Univ.Toyama, [2]WERC)

【目的】

近年、化石燃料の使用量の削減や CO2 排出量の抑制、さらに電力供給の問題など、草本や木質バイオマスなどの未利用なバイオマス資源を開拓し、その利用法を開発することが急務となってきた。特に、我国のような貧資源国では、新規なエネルギー資源の開発および有用化学物質の製造法の開発が進められている。このような背景から、我々は次世代型の発酵技術である糖化発酵同時進行(CBP)プロセスの新規開拓を行い、スエヒロタケ *Schizophyllum commune* が CBP によりリグノセルロースから直接 L-リンゴ酸(LMA)あるいはエタノールを選択的に生産できることを見出した。すなわち、本菌株は、セルラーゼを多量に分泌するとともに発酵代謝が可能である。しかし、分泌セルラーゼにおいて β-Glucosidase(BGL) および Cellobiohydrolase(CBH)の生産は良好であるものの、*endo*-β-Glucanse (EG)の分泌が乏しいことから、イオンビーム変異法を活用し、セルラーゼ生産の向上を図り各種リグノセルロースから効率良く L-リンゴ酸を生産できる変異株の構築を検討した。

【方法および結果】

本研究で使用した菌株は、*S.commune* NBRC4928 である。初めに、野生株 *S.commune* NBRC 4928 を 36℃、100 g / LGlucos, Xylose, α-Cellulase を基質として 15 日間の好気培養を行った結果、Glucose, Xylose では、LMA をそれぞれ 40.1, 39.5 g/L のリンゴ酸を生産した。一方、α-Cellulose の場合、24.5 g/L の LMA を生産できた。さらに、この培養において、BGL と CBH はそれぞれ 11.9 と 0.98 U/ml と極めて高い酵素生産が確認できたが、EG は 0.2 U/mL 程度とかなり低いことが判明した。そこで、(公財)若狭湾エネルギー研究センター(WERC)でカーボンイオンビームを 4928 株の菌糸懸濁液に対して照射強度 500 Gy で照射し、α-Cellulose 寒天培地でスクリーニングおよび 40℃での育種を行い、変異株 A および B を獲得した。両変異株ともα-Celluloae を基質とした培養において、EG の分泌生産量を向上でき、野生株では CBP が行えなかった Avicel, SigmaCell, もみ殻から LMA を良好に生産できた。さらに、α-Cellulose を基質とした嫌気培養において、LMA の生産は全く認められなかったものの、培養 9 日間でエタノールを 17.3 g/L も生産できた。また、現在、変異株においても CBP が実施できなかった稲わらおよび木粉に対して LMA 生産が達成できる変異株の育種を実施中である。

ion bream breeding, fungi, fermeation

発表責任者：星野一宏（khoshino@eng.u-toyama.ac.jp）

講演番号：2J28p10
講演日時：3 月 18 日 16:25～ J 校舎 28 会場

アカテガニ類が示すバイオマス分解活性の解析
Biomass degrading activities of land crab, *Chiromantes haematocheir*
知田 真之介、裏 佳織、馬場 保徳、○三宅 克英（石川県大資源研）
Shinnosuke Chida, Kaori URA, Yasunori BABA, ○Katsuhide MIYAKE (Ishikawa Pref. Univ.)

日本の海岸に面した森林、いわゆる水辺林では、アカテガニやクロベンケイガニなどの生息がよく観察される。これらの陸ガニ類は落ち葉や木片などのバイオマスを食料として利用することが知られている。これらのカニは森林海域間の物質循環と河口域の生態系（特に魚類生産）の中で重要な役割を果たしているが、そのバイオマス分解メカニズムについてはほとんどわかっていない。本研究では陸ガニ類の新規バイオマス分解システムを明らかにし、バイオマス有効利用技術への応用をはかることを目的としている。本発表ではアカテガニ及びクロベンケイガニ消化管由来懸濁液のバイオマス分解活性の解析について報告する。

加賀地方や能登地方の水辺林に生息するアカテガニを採集し、解剖して消化管抽出液を作製し、そのバイオマス分解能力を解析した。消化管は前腸（胃）、中腸腺（肝臓や膵臓に相当）、後腸に分けて回収し、サンプルとした。セルラーゼ活性はソモギネルソン法で、リグニン分解活性はグアヤコール酸化活性によって検討した。その結果、興味深いことに、非常に強いグアヤコール酸化活性を主に中腸腺から検出することができた。この中腸腺由来の強力なグアヤコール酸化活性はすべてのアカテガニ個体から見出されるわけではなく、一部のメスに限られることも明らかとなった。このことは、カニの食性研究で、メスの方が植物を好むといういくつかの報告と一致している。本発表ではこの強力なペルオキシダーゼ酵素の特徴についても報告する。一方、もう一つのバイオマス分解活性であるセルラーゼについては、基本的にどの臓器からも検出された。カニ自身のセルラーゼについては、既に有名なクリスマスアカガニなどでも報告されているので、検出された活性はカニ自身に由来する可能性が高いが、我々は腸内細菌の関与もあるのではと考え、研究を行っている。これまでにアカテガニ消化管から培養可能な細菌を分離しているが、その９割以上がセルラーゼ活性を示すことも明らかになっている。細菌の関与について検討するために、無菌飼育も行ったので、その結果についても報告する予定である。また、アカテガニだけでなく、食性の似ているクロベンケイガニの解析も行っており、類似点、相違点についても検討した。

land crab, lignin, cellulase

発表責任者：三宅克英（miyake@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：2J28p11
講演日時：3 月 18 日 16:50～ J 校舎 28 会場

# 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* へのセルラーゼ生産能の付与

Breeding of cellulase-producing *Saccharomyces cerevisiae*

○松崎 浩明、山凪 新平、上田 賢一、秦野 琢之（福山大生命工）
○Hiroaki MATSUZAKI, Shinpei YAMASAKI, Ken-ichi UEDA, Takushi HATANO (Fukuyama Univ.)

近年、エネルギー消費量の増大により化石燃料の枯渇が危惧されている。そこで、バイオマス資源を利用したエネルギー生産が注目されている。しかし、食糧となる糖・デンプン系バイオマスの利用は、食糧不足や食糧の価格高騰を招く。本研究では、アルコール発酵酵母 *Saccharomyces cerevisiae* への遺伝子導入によるセルラーゼ生産能の付与により、セルロース系バイオマスからのバイオエタノールの生産を目指している。当研究室の過去の研究で *Cryptococcus flavus* 由来のカルボキシメチル(CM)-セルラーゼ(CMC1)や *Saccharomycopsis fibuligera* 由来のβ-グルコシダーゼ(BGL1)の生産能を付与したが、セルロースからのエタノール生産量は十分ではなかった。エンド型とエキソ型など種々のセルラーゼの生産によりセルロース分解効率を高めることが重要であると考えた。そこで、BGL1 および細菌 *Cellulomonas fimi* 由来のエンド型セルラーゼ(cenA)とエキソ型セルラーゼ(cex)の３種のセルラーゼ生産能の付与を検討した。まず *cenA* 遺伝子と *cex* 遺伝子を *GAP* プロモーター、*MEL1* 分泌シグナル配列と *GAP* ターミネーターとの間に連結した *S. cerevisiae* 分泌発現型 *cenA* と *cex* を持つ YEp 型プラスミド pHM1061 を構築した。また、*BGL1* 遺伝子を *GAP* プロモーター下流に連結した分泌発現型プラスミド pHM1062 を構築した(分泌シグナル配列は *BGL1* の配列を使用)。pHM1061 と pHM1062 を導入した二重形質転換体は、コンゴレッド染色と *p*-NPG 活性によりセルラーゼとβ-グルコシダーゼを分泌生産していることが確認できた。しかし、セルラーゼ活性は低いと考えられた。さらに、*CMC1* 遺伝子を *GAP* プロモーター下流に連結した分泌発現型プラスミド pSC7(分泌シグナル配列は *CMC1* の配列を使用)を導入した三重形質転換体はコンゴレッド染色により二重形質転換体よりもセルラーゼ活性が高いと考えられた。三重形質転換体は CM セルロースを基質としてグルコース(または CM グルコース)を生じた。

cellulase, *Saccharomyces cerevisiae*, ethanol fermentation

発表責任者：松崎 浩明（matsuzak@bt.fubt.fukuyama-u.ac.jp）

講演番号：2J28p12
講演日時：3 月 18 日 17:05～ J 校舎 28 会場

# 同時糖化併行複発酵プロセスにおけるセルロース系エタノール生産のためのペントースリン酸経路遺伝子発現の最適化

# Optimization of gene expression of pentose phosphate pathway genes for effective production of cellulosic ethanol in simultaneous saccharification and co-fermentation process in *Saccharomyces cerevisiae*

○小林 洋介、佐原 健彦、扇谷 悟、鎌形 洋一、藤森 一浩（産総研・生物プロセス）
○Yosuke KOBAYASHI, Takehiko SAHARA, Satoru OHGIYA, Yoichi KAMAGATA, Kazuhiro E. FUJIMORI (BPRI, AIST)

【背景】*Saccharomyces cerevisiae*（*S. cerevisiae*)は Ethanol 生産に適した微生物の一つであるが、ヘミセルロースに由来するXylose等の五炭糖を効率的に利用することができない。そのため、セルロース系エタノールを効率よく生産するためには、Xylose 代謝遺伝子（XR-XDH、XI 等)を導入する必要がある。また、糖化と発酵を1つのプロセスで行う同時糖化併行複発酵 Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation（SSCF）において、Glucose と Xylose を同時に効率的に発酵するためには高い温度で安定して作用する酵素の利用が求められる。Xylose から変換された Xylulose 5-phosphate は、ペントースリン酸経路（PPP)及び解糖系を通して Ethanol に変換されるため、PPP の4つの遺伝子 *TAL1*, *TKL1*, *RKI1*, *RPE1* の発現量を適切に制御することが Ethanol 収率及び生産性向上には重要である。
【目的】本研究開発では、4つの PPP 遺伝子を異なる組み合わせで強制発現する株を作成し、高温条件下かつ実際のバイオマス組成に近い GlucoseとXyloseの両方を含む疑似糖化液およびサトウキビバガスを用いた SSCF を基質として用いて発酵試験を行い、最適な PPP 遺伝子の組み合わせについて検討を行った。
【方法・結果】*Scheffersomyces stipitis* 由来 XR-XDH または *Clostridium phytofermentans* 由来 XI を導入した *S. cerevisiae* IR-2 (haploid)株を親株とし、4種の PPP 遺伝子を相同組み換えによって *PHO13* 領域に挿入した株を作成した。これらの株を、85 g/L Glucose, 35 g/L Xylose を含む疑似糖化液を用い、36˚C で発酵試験を行った。副生物低下のため、XI 導入株は、XR-XDH 導入株よりも高い Ethanol 収率を示した。しかし、期待に反して *PHO13* を欠損させると、Xylose 消費及び Ethanol 収率は低下した。そのため、XI 導入株に、*S. cerevisiae* 及び耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* 由来 PPP 遺伝子を異なる組み合わせで *GPD2* 領域に挿入した株を作成し、同様に発酵試験を行った。その結果、Km*RKI1* と ScT*KL1* の組み合わせ（YK193)では、約 1.7 倍 Xylose 消費速度（発酵 24 時間）が向上した。これに、Km *TAL1*を追加すると（YK246)、さらに約 10%の向上が認められた。驚くべきことに、4種の PPP 遺伝子を導入すると、Xylose 消費速度、Ethanol 収率ともに著しく低下した。YK193 を用いて、水酸化ナトリウム処理サトウキビバガスを基質とする SSCF を行った結果、Ethanol 収率は約 3%向上し、発酵 72 時間で約 60.8 g/L の Ethanol を生産した（糖化率 85%の時に YPDX と同じ 120 g/L 相当の糖が供給される条件）。これらの結果は、*RKI1*と *TKL1* を発現強化することにより、実バイオマスを用いた SSCF においても効率的に Ethanol 生産が可能であることを示唆している。
※本研究は、バイオマスエネルギー技術研究開発/バイオ燃料製造の有用要素技術開発事業/有用微生物を用いた発酵生産技術の研究開発/C5C6 糖同時発酵微生物の開発（NEDO）において行った。

pentose phosphate pathway, xylose, fermentation

講演番号：2J28p13
講演日時：3 月 18 日 17:20～ J 校舎 28 会場

# 高効率セルロース系エタノール生産に適した遺伝子組換え出芽酵母のデザイン

# Successful design of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* for effective production of ethanol fuel from cellulosic biomass

○藤森 一浩、小林 洋介、佐原 健彦、扇谷 悟、鎌形 洋一 (産総研・生物プロセス)
○Kazuhiro E. FUJIMORI, Yosuke KOBAYASHI, Takehiko SAHARA, Satoru OHGIYA, Yoichi KAMAGATA (BPRI, AIST)

【背景】 第一世代バイオマスエタノールがでんぷん等の食料を原料とするのに対し、第二世代バイオマスエタノール(セルロース系エタノール)は、農業残さ等に含まれるセルロース・ヘミセルロースに由来する Glucose、Xylose 等の C5C6 糖を炭素源として利用することで、食料と競合せずにエタノール生産が可能になる。近年、欧米企業を中心に、セルロース系エタノール生産デモプラントが複数建造され、まさに商業生産に向けて一歩踏み出した。それに合わせて世界中で C5C6 糖同時発酵微生物の開発が進められてきているが、最も経済合理性があると考えられる糖化と発酵を1つのプロセスで行う同時糖化併行複発酵プロセス (Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation, SSCF) において優れた発酵性能を有する C5C6 糖同時発酵微生物の開発は未だ発展途上であると言わざるを得ない。
【目的】 本研究開発では、我々がこれまで積み上げてきた効率的 Ethanol 生産に資する有用要素技術を一つの産業用酵母に集約・実装し、商業利用可能な Release Candidate の開発を目的として、以下の研究開発を行った。また、作成した株を用いて、YPDX 疑似糖化液及びサトウキビバガスを用いた SSCF において、Xylose 消費速度、Ethanol 収率、Ethanol 生産性等の発酵性能について検証を行った。
【方法・結果】 産業用酵母 IR-2 (MAT α)に Xylose 代謝遺伝子として、*Clostridium phytofermentans* 由来 *xylA* 遺伝子高活性型変異体 Cp*XI* 及び Sc*XKS1* を導入した B4 株をベースに、さらなる Xylose 消費速度の向上のために、最適な組み合わせのペントースリン酸経路遺伝子を染色体挿入し、高濃度の Xylose を素早く資化可能な HEX1-22 変異及び SXM1 変異を導入した。加えて、Ethanol 収率を向上するために *GPD2*、*GRE3* を欠損させることで B16 株を作成した。さらに、HO-express 法により MAT conversion を行い、B16 YK231(MAT**a**)を単離し、接合させることによって IR-2 B22(MAT α / MAT**a**)を得た。その結果、これらの株は、疑似糖化液 YPDX (85 g/L Glucose, 35 g/L Xylose)を用いた発酵試験において、発酵開始後 24 時間までに投入した 120 g/L 相当の糖をほぼ全て消費し、発酵開始 24 時間における Ethanol 生産性約 2.3 (g/L/h)、最大 Ethanol 収率約 0.475 g/g であった。また、水酸化ナトリウム処理サトウキビバガスを基質とする SSCF (糖化率 85%の時に、YPDX と同じ 120 g/L 相当の糖が供給される条件)において、発酵開始 72 時間以内に 60.2 g/L の Ethanol を生産した。これらの結果は、B16/B22 株がセルロース系エタノール生産菌として優れた発酵性能を持つことを示しており、セルロース系エタノール商業生産の端緒となると期待される。
※本研究は、バイオマスエネルギー技術研究開発/バイオ燃料製造の有用要素技術開発事業/有用微生物を用いた発酵生産技術の研究開発/C5C6 糖同時発酵微生物の開発 (NEDO)において行った。

Cellulosic ethanol, SSCF process, Metabolic engineering

発表責任者：藤森一浩 (k-fujimori@aist.go.jp)

講演番号：2J28p14
講演日時：3 月 18 日 17:35～ J 校舎 28 会場

# イオンビーム変異誘導法による耐熱性乳酸生産糸状菌の Xylose 代謝向上

# Development of xylose metabolism on thermotolerant lactic acid-producing fungi by ion-beam mutation

○高野 真希[1]、山下 聖樹[1]、畑下 昌範[2]、星野 一宏[1] ([1]富山大院理工、[2]若狭湾エネ研)
○Maki TAKANO[1], Satoki YAMASHITA[1], Masanori HATASHITA[2], Kazuhiro HOSHINO[1] ([1]Univ. Toyama, [2]WERC)

【目的】*Rhizopus* 属糸状菌は好気条件下で乳酸、嫌気条件下でエタノールを生産する特徴を有する。特に *R. oryzae* NBRC5384 は乳酸生産に優れ、さらに 40℃以上の高温でも増殖および発酵が可能な菌株である。近年需要が高まるバイオマスを原料としたバイオリファイナリーにおいて、バイオプラスチック原料となる乳酸生産が特に期待されており、耐熱性を有する本菌株はバイオマスからの乳酸生産に有効に利用できる。しかし現状ではリグノセルロースの主要成分である Xylose 発酵が十分ではなく、効率的な乳酸生産のための菌の育種が求められる。そこでスペクトルが広く高頻度な変異誘導が可能なイオンビームに着目した。本研究ではイオンビーム変異誘導法による 5384 株の Xylose 発酵変異株の構築を行い、さらに親株と本変異株の Xylose 代謝の変化について生化学および分子生物学的に比較検討した。
【方法・結果】*R. oryzae* NBRC5384 の分生子懸濁液に若狭湾エネルギー研究センター(WERC)にてイオンビーム (Carbon 2,500 Gy、 LET 42.0 KeV/μm) を照射し変異誘導を行った。照射後の分生子は Xylose を基質とした培地で 40℃にて静置培養を行い、増殖可能であった 112 株を取得した。これらの変異株をさらに Xylose 基質培地で 40℃における好気振盪培養を行い、乳酸生産量が高い XM-41 株を選択した。親株および本変異株の乳酸生産能を比較するため、50 g/L Xylose を炭素源として 28℃および 40℃での好気振盪培養を行った結果、28℃では親株および変異株とも 8-13 g/L の乳酸を生産できた。一方、40℃では親株は Xylose をほとんど消費できず乳酸が 0.04 g/L 程度確認できた。XM-41 株では親株より良好に Xylose を消費し、培養 120 h で 14.7 g/L の乳酸を生産できた。これらの結果より、親株 NBRC5384 の Xylose 代謝関連酵素群は、40℃では活性が低下するため Xylose 消費が抑制される。しかし変異株 XM-41 ではイオンビーム照射によりこれらの酵素群の耐熱性が向上したと推測される。そこで 28℃および 40℃において培養した両菌株の菌糸を回収し、細胞内の Xylose reductase(XR)、Xylitol dehydrogenase (XDH)および Lactate dehydrogenase (LDH)活性を測定した。28℃では親株と変異株の各酵素活性にほとんど差は認められなかった。しかし 40℃では培養 24 h に XM-41 株の XR、XDH および LDH の活性が親株と比較して約 2 倍以上高いことから、Xylose 代謝が培養初期から良好に進行したため乳酸生産が行われたと考えられる。以上の結果より、イオンビーム照射により Xylose 代謝酵素群の発現または耐熱性に変異が起こり、高温での Xylose から乳酸への代謝が活性化した XM-41 株が構築できた。現在、両菌株の Xylose 代謝酵素遺伝子の発現を比較検討している。

ion-beam, *Rhizopus*, xylose fermentation

発表責任者：星野一宏（khoshino@eng.u-toyama.ac.jp）

講演番号：2J28p15
講演日時：3 月 18 日 17:50～ J 校舎 28 会場

# 細胞内レドックスバランスを維持できるキシロース資化酵母の性能向上
# Enhancement of engineered Saccharomyces cerevisiae potential for assimilating xylose

○佐々木 勇輔[1,2,3]、高木 俊幸[2,3]、元根 啓佑[2,3]、黒田 浩一[2,3]、植田 充美[2,3]（[1]京大院・総合生存、[2]京大院農・応用生命、[3]JST, CREST）
○ Yusuke SASAKI[1,2,3], Toshiyuki TAKAGI[2,3], Keisuke MOTONE[2,3], Kouichi KURODA[2,3], Mitsuyoshi UEDA[2,3] ([1]GSAIS (Grad. Sch. Adv. Integ. St.), [2]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [3]JST, CREST)

**[背景・目的]**

化石燃料は、シェールオイルなどの活用もあるが、その埋蔵量が限られており将来的な資源の枯渇が危惧されている。そのため、新たな持続可能なエネルギー原料としてバイオエタノールなどの創出が必要である。食糧需要との競合や、耕作可能面積の問題から、非可食バイオマスである陸上や海洋資源のさらなる活用が必須といえる。5 炭糖のキシロースを含むキシランは、それら資源に共通する構成成分である。そこで本研究では、非可食バイオマスからのエタノール生産を促進するため、ソフトバイオマス資化性 *Clostridium cellulovorans* 由来のキシロース資化酵素に注目し､我々が開発してきた酵母ディスプレイ法[1]により共発現など新規にデザインした酵母の育種を試みた。

**[方法・結果]**

我々はこれまでに、*C. cellulovorans* 由来キシロースイソメラーゼ（XI）を細胞表層提示させた酵母株を創製し、キシロースからのバイオエネルギー生産を報告してきた[2]。しかし、XI 単体では、触媒及び発酵効率が非常に低いという難点があった。そのため本研究では、XI に対する金属補因子の検討を行った。キシロースを基質とした細胞表層での酵素反応の際、各種金属カチオンを添加し、生産されたキシルロースの定量により、酵素活性を比較した。その結果、Co(II)の添加により酵素活性を格段に向上させることができた。次に、Co(II)添加がエタノール発酵及ぼす影響を検証した結果、エタノール生産量及びキシロース資化量を増大させることができた。

キシラナーゼ及びキシロシダーゼを酵母細胞表層に提示した株を構築した株を、XI を細胞表層提示した酵母と共に、Co(II)添加したキシランを唯一の炭素源とする培地で培養したところ、キシランからのエタノール生産量を増大させることに成功したのでまとめて報告する[5]。

[1] K. Kuroda, M. Ueda, *Biomolecules*, 3, 632-650 (2013)
[2] M. Ota, et al., *Biotechnol. Prog*., 29, 346-351 (2013)
[3] Y. Sasaki, *et al*., submitted.

bioethanol, Saccharomyces cerevisiae, xylose isomerase

講演番号：2J28p16
講演日時：3 月 18 日 18:05～ J 校舎 28 会場

# Target-AID を利用したゲノム編集による高収率ブタノール発酵性クロストリジウム属微生物の育種
# Breeding of high yield butanol fermentative Clostridia by genome editing with Target-AID

○向山 正治[1]、市毛 栄太[1]、田中 勉[2]、西田 敬二[2]、近藤 昭彦[2] ([1]株式会社日本触媒、[2]神戸大学)
○Masaharu Mukoyama[1], Eita Ichige[1], Tsutomu Tanaka[2], Keiji Nishida[2], Akihiko Kondo[2] ([1]Nippon Shokubai Co., Ltd., [2]Kobe University)

【目的】n-ブタノールは化学品として広く使用されており、自動車向けの燃料としても利用可能であるため、近年再生可能原料からの化学品生産の一環として ABE 発酵が再検討されているが、ブタノール収率が低い問題がある。2014 年度農芸化学会大会において、日本で分離された ABE 発酵菌 *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* ATCC27021 株を用いて GroupII イントロンを利用した遺伝子破壊により n-ブタノールを高収率で生成するホモブタノール発酵菌株を得たことを報告した。[1)]今回はゲノムを切らないゲノム編集技術 Target-AID[2)]を利用し、1 塩基変異で上記の株と同等の性能を有する菌株の作成を試みた。ブタノール高収率株の作成には *pta*、*ptb1* 遺伝子の破壊が有効であるが、今回はこのうち *pta* 遺伝子の破壊を行った結果を報告する。
【方法】pKNT19 プラスミドをベースとして Target-AID を構成する d-CAS9-PmCDA と g-RNA を発現する遺伝子断片を挿入し、クロストリジウム用のゲノム編集用ベースプラスミドを構築した。次に Pta の機能喪失のため①*pta* 遺伝子中に終止コドンを形成させる②Pta 活性中心と推定した Arg を他のアミノ酸に改変する [3)]変異を導入できる g-RNA をデザインし、上記ベースプラスミドに挿入しゲノム編集用プラスミドを作成した。これらプラスミドで *C. saccharoperbutylacetonicum* ATCC27021⊿ptb1 株（GroupII イントロンによる ptb1 破壊株）を形質転換、得られた形質転換体を継代培養した後、単一コロニーを形成させ、pta 配列を解析した。更に他のグラム陽性菌への本法の適用も試みた。
【結果】*pta* の 932 番目の G を A に変換することによって、活性中心付近と推定された Arg311 が Lys に変わった株を得た。この株の培養評価の結果、n-ブタノール収率が GroupII イントロンで *pta* と *ptb1* を二重破壊した株と同程度に向上することが確認できた。従って 1 塩基変異で GroupII イントロンと同程度の遺伝子破壊が可能であることが示された。更に *Corynebacterium glutamicum*、*Brevibacillus chosinensis* でも遺伝子改変をすることができた。Target-AID はゲノム上の塩基を脱アミノ化することで塩基が変換されゲノムの切断は行わないため、ゲノムの組み換え反応を伴わない。従って以上の結果から、組み換え技術によらない新しい産業用発酵菌株開発の可能性が示された。

1）市毛、向山、中山　2014 年度日本農芸化学会大会要旨集
2）西田、近藤　2015 年度日本生物工学会大会要旨集
3）Lawrence et.al.　JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 2006, p. 1143–1154

Clostridium saccharoperbutylacetonicum ATCC27021, Homo butanol fermentation, Target-AID

発表責任者：向山正治（masaharu_mukoyama@shokubai.co.jp）

講演番号：2J29a01
講演日時：3 月 18 日 09:20～ J 校舎 29 会場

# ビオチン化コンドロイチン硫酸オリゴ糖の合成

# Synthesis of biotinylated chondroitin sulfate oligosaccharides

○上村 明寿美[1]、松下 健也[2]、中田 有美[1]、武田-奥田 尚子[1]、田村 純一[1,2] ([1]鳥取大地域、[2]鳥取大院工)
○Asumi UEMURA[1], Kenya MATSUSHITA[2], Tomomi NAKATA[1], Naoko TAKEDA-OKUDA[1], Jun-ichi TAMURA[1,2] ([1]Tottori Univ., [2]Grad. School Eng., Tottori Univ.)

【目的】

コンドロイチン硫酸(CS)は、D-グルクロン酸(GlcA)と N-アセチル-D-ガラクトサミン(GalNAc)で構成される二糖単位の繰返しからなる直鎖状の多糖である。CS は、硫酸基の位置や数によって、A 型や D 型などの硫酸化パターンに分類され、その違いによって特徴的な生理活性をもつことが知られている。その一方で、天然由来の CS 多糖は特定の硫酸化パターンの繰返し二糖のみで構成されておらず、生理活性の違いが糖鎖のどの微細構造に起因しているか明らかになっていない。しかし、精密化学合成によって得られる構造の確かなオリゴ糖を使用することによって、糖鎖の微細構造のもつ機能を明らかにすることができる。これまでに我々は単一な構造をもつ OO、AA、EE 型ビオチン化四糖の合成に成功し、BIACORE システムを用いてミッドカインとの親和性を明らかにしてきた[1)]。一方、近年 A 型と特異的に結合するとされていた抗体が D 型などの他の硫酸化パターンも認識していることが報告されている[2,3)]。そのため、抗体が認識する CS 認識ドメインを明らかにし、医薬品等の開発に利用するためには、天然由来の CS により近い、異なる硫酸化パターンからなるハイブリッド型コンドロイチン硫酸を合成する必要がある。

【方法・結果】

本研究では、これまでに合成されていなかった CC、DD 型のほか、ハイブリッド型である DA 型ビオチン化四糖の合成を行うことにした。それぞれの硫酸化パターンに対応するように適切な保護基を導入した繰返し二糖ユニットの合成に成功した。得られた二糖ユニットは数工程を経て四糖に伸長した後、位置選択的硫酸化、脱保護等を経て標的とするビオチン化 CS 四糖に誘導している。

1) J. Tamura et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.,* **22**, 1371-1374(2012).
2) B. T. S. Susarla et al., *J. Neurochem.,* **119**, 868-878 (2011).
3) S. S. Deepa et al., *Glycobiology*, **17**, 631-645 (2007).

Chondroitin sulfate, Synthesis, Oligosaccharide

講演番号：2J29a02
講演日時：3 月 18 日 09:35～ J 校舎 29 会場

# 野生のニホンジカ鹿茸に含まれるコンドロイチン硫酸の分析

Analytical study of chondroitin sulfate in wild Japanese deer antlers

○三谷 真鈴、植村 優那、大村 優華、谷 明里、武田-奥田 尚子、田村 純一（鳥取大地域）
○Marin MITANI, Yuna UEMURA, Yuka OMURA, Akari TANI, Naoko TAKEDA-OKUDA, Jun-ichi TAMURA (Dep. Regional Environ., Tottori Univ.)

## [目的]

近年、鳥取県や近隣の県では野生のニホンジカが急増し、農作物への食害などが問題となっている。鳥取県では年間数千頭ものシカを捕獲し、皮や肉を利用しているが、他の部位は廃棄されている。本研究では廃棄部位である角に注目した。シカの角は春先から生え始め、袋角、鞍子、三岔茸の順に枝分かれしながら成長し､秋には完全に骨化した鹿角となる｡冬の終わりには角が落ちるが、春先に再び生え始める。春先から秋までの成長途中の角は鹿茸(ろくじょう)と呼び、上部の軟骨組織は非常に速く骨に変化する特徴をもつ。細胞外マトリックスは、骨形成や細胞の分化、増殖の調整の役割を担う。細胞外マトリックスの主要成分の一つであるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン（CSPG）は、骨化に関与し、ニワトリの肢や翼を形成する際、胚の間充織で CS の硫酸化パターンが変化することが知られている。CS は、D-グルクロン酸と N-アセチル-ガラクトサミンの二糖単位の繰り返しによって構成された直鎖多糖であり、硫酸基の結合する位置や数によってＡ型やＣ型などのサブクラスに分類されている。CS は複数の硫酸化パターンで構成されたヘテロな構造である。鹿茸中の CS の硫酸化パターンや含有量を明確にすることで、骨化における CS の役割を分子レベルで明らかにする基盤情報を提供でき、医薬品開発に重要な知見を与えると考えた。本研究では成長初期段階にある野生のニホンジカの鹿茸中の CS の含有量と組成（硫酸化パターン）を明らかにすることを目的とした。

## [方法・結果]

野生ニホンジカの鹿茸（袋角・鞍子・三岔茸）をそれぞれ細断し、脱脂した後、減圧乾燥した。続いて、脱脂乾燥物のタンパク質をプロテアーゼによって分解し、透析した。最後に、エタノールを用いて糖鎖を沈殿させた。得られた糖鎖は、コンドロイチナーゼで二糖単位にまで分解し、HPLC を用いて CS の硫酸化パターンと含有量を測定した。鹿茸の骨化した下部では脱脂乾燥物 100 g あたり数十 mg 程度の CS しか含まれていなかった。しかし、先端部には脱脂乾燥物 100 g あたり 1 g 以上の CS が含まれていることが明らかとなった。

Deer antler, Chondroitin sulfate, Analysis

講演番号：2J29a03
講演日時：3 月 18 日 09:50～ J 校舎 29 会場

異なる生息環境下での鹿茸に含まれるコンドロイチン硫酸の比較分析
Comparative study of chondroitin sulfate in velvet deer antlers grown under different environment

○武田-奥田 尚子[1]、全 炳台[2]、李 致鎬[3]、金 守基[3]、田村 純一[1]([1]鳥取大地域、[2]建国大動物生命、[3]建国大医療生命)
○Naoko TAKEDA-OKUDA[1], Byong-Tae JEON[2], Chi-Ho LEE[3], Soo-Ki KIM[3], Jun-ichi TAMURA[1] ([1]Dep. Regional Environ., Tottori Univ., [2]College of Animal Bioscience and Technology, Konkuk Univ., [3]College of Biomedical and Health Sciences, Konkuk Univ.)

［目的］

シカの角は古来より漢方薬や民間伝承薬として珍重されており、現在でも中国や韓国からの輸入した角が使用されている。そのため、韓国ではニホンジカなどを飼育することで角の安定供給を行っている。シカの角は、コラーゲンやリン酸カルシウムなどで構成されていることが知られているが、近年飼育されたルサジカやアカシカの成長初期段階の角（鹿茸：ろくじょう）にはコンドロイチン硫酸（CS）も含まれていることが報告された。しかし、先行研究では鹿茸中の CS 含有量や分子レベルでの構造解析結果などに差異があり、実験手法や種、生息環境などの違いによる差か明らかでない。CS は、骨形成や細胞の分化、増殖の調整などの役割を担っており、D-グルクロン酸と N-アセチル-D-ガラクトサミンの二糖単位の繰返しによって構成された直鎖多糖である。また、硫酸基の結合する位置や数によって A 型や C 型などのサブクラスに分類されており、CS は複数の硫酸化パターンで構成されたヘテロな構造である。

最近我々は、日本で捕獲された野生ニホンジカの鹿茸に含まれる CS 含有量や硫酸化パターンを明らかにした。そこで、韓国で飼育されたニホンジカと鳥取県で捕獲された野生ニホンジカの鹿茸を用いれば、生息環境が CS の含有量と硫酸化パターンにどのような影響を与えるかを明確にすることができると考え、韓国で飼育されたニホンジカ鹿茸に含まれる CS の含有量と硫酸化パターンを分析した。

［方法・結果］

鹿茸（鞍子・三岔茸）をそれぞれ細断し、脱脂した後、減圧乾燥させた。脱脂乾燥物のタンパク質をプロテアーゼによって分解し、透析した。最後に、エタノールを用いて糖鎖を沈殿させ、精製糖鎖を得た。得られた精製糖鎖は、コンドロイチナーゼで二糖単位にまで分解し、HPLC を用いて糖鎖の硫酸化パターンと含有量を測定した。鹿茸の先端部には、多いものでは脱脂乾燥物 100 g あたり 1 g 以上の CS が含まれていることがわかったが、骨化した下部では数十 mg 程度しか含まれていなかった。

Deer antler, Chondroitin sulfate, Analysis

講演番号：2J29a04
講演日時：3 月 18 日 10:05～ J 校舎 29 会場

# Identification of UDP sialyl N-acetyllactosamine in colostrum of addax, an antelope species

○Ganzorig Khuukhenbaatar[1], Masashi Sasaki[1], Takuya Asakawa[2], Kenji Fukuda[1], Tadasu Urashima[1] ([1]Obihiro Univ., [2]Himeji Central Park)

Mammalian milk/colostrum usually contains the oligosaccharides along with the predominant lactose. Milk or colostrum of a few species including sheep, pig, reindeer and human contain oligosaccharide nucleotides, too. Its biological significance has not been clarified. To find this component, we study the colostrum of addax, an antelope species, in this study.

The carbohydrate fraction was obtained from the colostrum by extraction with four volume of chloroform/methanol (2:1, v/v), and then the acidic oligosaccharide fraction was separated from lactose and neutral oligosaccharides by gel filtration with BioGel P-2. Each oligosaccharide was purified from this fraction with high performance liquid chromatography with Amide-80 column and characterized by $^{1}$H-NMR.

Neu5Gc(α2-6)Gal(β1-4)GlcNAc-UDP was characterized along with the following acidic oligosaccharides: Neu5Ac(α2-8)Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-4)Glc, Neu5Gc(α2-8)Neu5Gc(α2-3)Gal(β1-4)Glc, Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-4)Glc, Neu5Gc(α2-6)Gal(β1-4)GlcNAc, Neu5Gc(α2-3)Gal(β1-4)Glc, Neu5Ac(α2-6)Gal(β1-4)Glc and Neu5Gc(α2-6)Gal(β1-4)Glc.

UDP sialyl N-acetyllactosamine, UDP-oligosaccharide, colostrum of addax

発表責任者：浦島　匡（urashima@obihiro.ac.jp）

講演番号：2J29a05
講演日時：3 月 18 日 10:20～ J 校舎 29 会場

# 希少糖 6-デオキシアルトロースを含む N-結合型糖鎖の発見

# Discovery of N-glycans containing a rare sugar, 6-deoxyaltrose

○長束 俊治[1,2]、半澤 健[2]、田幸 正邦[3]、石田 秀治[4]([1]新潟大理、[2]新潟大院自然、[3]琉球大健康長寿科学研、[4]岐阜大応用生物)
○Shunji NATSUKA[1,2], Ken Hanzawa[2], Masakuni Tako[3], Hideharu Ishida[4] ([1]Niigata Uinv., Facl. Sci., [2]Niigata Univ., Grad. Sch. Sci., [3]Ryukyu Univ., Health Longev. Res. Lab., [4]Gifu Univ., Facl. Appl. Bio. Sci.)

ゼブラフィッシュの胚で発現している糖鎖を発生段階に沿って網羅的に解析したところ、未知の末端構造を持つ *N*-結合型糖鎖が検出された。その糖鎖は、他のコンプレックス型糖鎖と同様に発生の咽頭胚期から発現が顕著になり、孵化の時期まで増加した。多段階の質量分析によりその末端構造は dHex1-3HexNAc1-3HexNAc1-であり、バイアンテナ型糖鎖の α1-6 ブランチ側の末端ガラクトースから伸長していることが分かった。糖組成分析と酵素消化から、デオキシヘキソースはフコース以外の 6-デオキシヘキソースであること、２番目の糖は α-GalNAc であること、３番目の糖は β-GlcNAc であることが分かった。岩崎らによってニッコウイワナの卵に 6-デオキシアルトロース(6dAlt)を含む *O*-結合型糖鎖の存在が報告されていたことから[1)]、当該の 6-デオキシヘキソースが 6dAlt である可能性を検証した。ハツタケのグルカン多糖[2)]から弱酸水解により 6dAlt を優先的に遊離させ標品とした。ホウ酸キレート陰イオン交換 HPLC を用いた単糖分析により、当該の 6-デオキシヘキソースは 6dAlt と一致した。以上の分析からゼブラフィッシュ胚由来の新規な末端構造を持つ *N*-結合型糖鎖の構造は、

Siaα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3[6dAlt(β)1-3GalNAcα1-3GlcNAcβ1-(3)Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6]Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc

であると推定できた。また、糖タンパク質を有機溶媒変性により不溶化し沈殿させて分別分析したところ、他の多くの *N*-結合型糖鎖は沈殿画分に回収されたが、当該糖鎖は可溶性画分に留まった。質量分析により当該糖鎖は、アスパラギンを含む糖ペプチドとして存在していることが分かった。さらに、受精後 36 時間の胚から卵膜を除き、胚を洗浄した後に 12 時間培養をしたところ胚培養液中から当該糖ペプチドが検出されたことから、当該糖ペプチドは発生中に胚から卵膜の内側へと分泌されていることが推測された。6dAlt はフコースの C5 エピマーであるのでその生合成は、GDP-マンノースから 4,6 位の脱水と 3 位の反転を経る経路と、糖鎖に付加した後にフコースの 5 位を反転する経路が考えられるが、フコースを持つ類似構造がまったく検出されなかったため、先の経路の可能性が高いと考えられる。

1) Iwasaki M, *et al. Eur.J.Biochem.*, **168** (1987) 287-192.
2) Tako M, *et al.Carbohydr.Res.*, **350** (2012) 25-30.

rare sugar, N-glycan, zebrafish

発表責任者：長束俊治（natsuka@bio.sc.niigata-u.ac.jp）

講演番号：2J29a06
講演日時：3 月 18 日 10:45～ J 校舎 29 会場

# 生息環境の異なる魚類に含まれるコンドロイチン硫酸の分析

Analytical study of chondroitin sulfate in the fish grown under different environment

○田村 純一、上田 健人、武田-奥田 尚子（鳥取大地域）
○Jun-ichi Tamura, Kento Ueda, Naoko Takeda-Okuda (Tottori Univ.)

【目的】コンドロイチン硫酸は，医薬品やサプリメントとして近年需要が増加している。現在市販されているコンドロイチン硫酸は主にサメやブタ由来であるが，捕獲規制や感染症などによる原料の安定供給が困難になることが想定されるため，代替資源の探索が必要である。我々は魚類に注目し，コンドロイチン硫酸が多く含まれる魚種やその部位を探索している。コンドロイチン硫酸はグルクロン酸と N-アセチルガラクトサミンで構成される二糖の繰返し構造からなり，特定の水酸基が硫酸化されている。この硫酸化パターンはさまざまな生化学的機能発現に重要であり，資源生物やその部位に特異的な硫酸化パターンを見いだすことは医薬品の開発にもつながる。今回我々は，異なる環境に生息する数種類の魚類について，コンドロイチン硫酸の単離精製を行い，その含有量と硫酸化パターンを解析したので報告する。

【方法と結果】数種の魚類について，部位別に粉砕，脱脂，タンパク質の分解除去などを行い，コンドロイチン硫酸を単離精製した。得られた精製糖鎖をコンドロイチナーゼ ABC によって二糖単位にまで分解し，HPLC で得た不飽和二糖ピークから硫酸化パターンと含有量を求めた。その結果，生息域が異なる同じ目（もく）の魚にコンドロイチン硫酸含有量が極端に異なるものがあることを見いだした。

Chondroitin sulfate, Glycosaminoglycan, Fish

講演番号：2J29a07
講演日時：3 月 18 日 11:00～ J 校舎 29 会場

マルトトリオース生成アミラーゼの糖転移活性を用いた *p*-ニトロフェノール配糖体の合成
Synthesis of *p*-nitrophenyl glucosides by transglycosylation activity of maltotriose-forming amylase
○殘華 智子、川口 剛司、炭谷 順一、谷 修治（阪府大院生還）
○Tomoko ZANKA, Takashi KAWAGUCHI, Jyun-ichi SUMITANI, Syuji TANI (Osaka Pref. Univ.)

【背景・目的】化合物の水溶性や安定性を改善する方法の１つとして配糖化が知られているが，配糖体を合成する酵素のほとんどは単糖，または不特定の重合度のオリゴ糖を転移させるもので，特定のオリゴ糖を転移させる酵素はあまり知られていない。*Kitasatospora* sp.MK-1785 株由来マルトトリオース生成アミラーゼ（G3Amy）は澱粉からマルトトリオース（G3）を特異的に生成するエキソ型 α-アミラーゼである。G3Amy は生成物を G3 とする加水分解活性に加えて，切り出した G3 を糖のみならず水酸基を有する化合物に転移させる糖転移活性も有している。本酵素の糖転移活性を用いれば，G3 特異的な配糖体の効率的な合成が可能となる。しかしながら，産業レベルの配糖体合成のためにはさらなる加水分解活性の低下と糖転移活性の上昇が望まれる。以前の研究で，X線結晶構造解析により取得された野生型 G3Amy の構造を元に多数の G3Amy 変異酵素（多重変異酵素を含む）が作製された。その中から糖転移反応における糖受容体をグルコースとした時，加水分解活性に対する糖転移活性が大幅に上昇した変異酵素 L191R が取得されている。臨床診断における測定項目の１つとして血清中または尿中のα-アミラーゼ測定があり，活性測定用の基質としてエチリデン-*p*-ニトロフェニル-α-D-マルトヘプタオシド（Et-G7-*p*NP）が推奨されている。本研究では，この Et-G7-*p*NP に含まれる *p*-ニトロフェニル G7 配糖体（*p*NP-G7）を最終目的産物として，まず *p*-ニトロフェニル-α-D-グルコピラノシド（*p*NP-G1）から *p*-ニトロフェニル G4 配糖体（*p*NP-G4）の合成を G3Amy 変異酵素を用いて行った。用いる変異酵素は，変異体 L191R のX線結晶構造解析から反応メカニズムの考察を行った上で選抜を行った。

【方法・結果】 変異酵素 L191R のアポ型と加水分解生成物である G3 との複合体，G3+G4 複合体の結晶構造を得た。構造の比較から R191 側鎖はプラス側サブサイトに存在する基質と相互作用しているようであり，その他の構造変化は見られなかったため糖転移活性が増大する理由として R191 側鎖が活性部位近傍で糖受容体の導入を補助していることが考えられた。これらの考察から L191R を含む二重変異酵素を中心とした多数の G3Amy 変異酵素を *p*NP-G4 の合成に用いた。G3 受容体として *p*NP-G1，G3 供与体として可溶性澱粉を用いて反応させ，薄層クロマトグラフィーで *p*NP-G4 と考えられる生成物を確認した。なかでも生成物が多かったものについては，高速液体クロマトグラフィーで詳細な分析と合成の条件検討を行った。今後は *p*NP-G1 に対する糖転移活性を指標として，さらなる変異酵素の取得や，効率的な連続合成反応のための条件について検討していく予定である。

transglycosylation activity, α-amylase, Synthesis

発表責任者：殘華　智子（swc02033@edu.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：2J29a08
講演日時：3 月 18 日 11:15～ J 校舎 29 会場

ニワトリ雄性生殖巣における CD52 様タンパク質の発見
Discovery of the CD52-like protein in male reproductive tissues of chicken
○北島 健[1,2]、鈴木 英里子[1,2]、木下 圭司[3]、大森 保成[3]、宮田 真路[2]、佐藤 ちひろ[1,2] ([1]名大生物機能セ、[2]名大院生命農学、[3]名大鳥類バイオセ)
○Ken KITAJIMA[1,2], Eriko Suzuki[1,2], Keiji Kinoshita[3], Yasushige Ohmori[3], Shinji Miyata[2], Chihiro Sato[1,2] ([1]Nagoya Univ. BBC, [2]Nagoya Univ. Grad. Sch. Bioagr. Sci., [3]Nagoya Univ. ABRC)

CD52 は、哺乳類の雄性生殖巣および白血球に存在する高度に糖鎖付加された GPI アンカータンパク質であり、これらの細胞の特異な抗原性を担うことが知られている。また、CD52 は哺乳類特異的で他の脊椎動物における存在の報告はなく、進化的にも特徴的な分子である。我々は、最近、精子上の脂質ラフトに存在する糖鎖に着目して、その機能解明を目指す途上で、ブタ精子の脂質ラフトに局在する糖鎖に富む分子として CD52 を同定し、その分子が細胞内カルシウムイオン濃度（$[Ca^{2+}]_i$）の制御に関わることを明らかにした（Kasekarn et al. 2012; Kanazawa et al. 2013)。一方、我々はウニ精子においても、脂質ラフトに局在して高度に糖鎖付加された GPI アンカータンパク質 flagellasialin の存在を見出し、それが 精子の$[Ca^{2+}]_i$と運動性を制御することを明らかにしている（Miyata et al. 2004; 2006)。以上のことから、我々は、動物精子には種を超えて脂質ラフト局在の糖鎖に富む GPI アンカータンパク質が存在して、精子の$[Ca^{2+}]_i$を制御するという仮説をたてるに至った。本研究はこの仮説の検証を目的として、鳥類ニワトリに着目して CD52 様分子の存在を探索した。

哺乳類 CD52 遺伝子がコードする前駆体タンパク質は、シグナル配列と GPI アンカーシグナルにおいて比較的高い種間相同性があるが、それに挟まれた 10～24 アミノ酸残基長の成熟タンパク質には種間相同性が殆どない。まず、哺乳類 CD52 遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列をもとにデータベース検索を行ったところ、鳥類を含むいずれの生物においても類似配列は見出されなかった。次に、ゲノム上の CD52 遺伝子を含む領域のシンテニーを解析したところ、ヒトとマウス間でシンテニーが存在することが判明した。そこでニワトリのゲノムにおいてシンテニー解析した結果、CD52 遺伝子に相当する領域にひとつの未知遺伝子が見出され、CD52-like と命名した。CD52-like 遺伝子はニワトリ雄性生殖巣で発現しており、その cDNA 配列からシグナル配列と GPI アンカーシグナルを有する 12 アミノ酸残基からなる成熟タンパク質であることが明らかになった。成熟ペプチドには糖鎖が 2～3 本存在することが推定され、糖鎖に富む GPI-アンカータンパク質であるという哺乳類 CD52 と共通の特徴がある。以上のことから、ニワトリ CD52-like は哺乳類 CD52 のオーソログ遺伝子であることが明らかになった。

CD52, GPI-anchor, sperm

講演番号：2J29a09
講演日時：3 月 18 日 11:30～ J 校舎 29 会場

# 病原性真菌 *Cryptococcus neoformans* は EGCrP2 によって免疫賦活糖脂質を分解することで宿主免疫系から逃避する

# *Cryptococcus neoformans* could escape from innate immune system through degradation of immuno-stimulating fungous glycolipids by EGCrP2

○渡辺 昂[1]、藤田 実花[1]、今井 崇史[2]、永田 雅大[2]、谷 元洋[3]、本田 智美[1]、角田 佳充[1]、石橋 洋平[1]、沖野 望[1]、山崎 晶[2]、伊東 信[1]([1]九大院・農・生命機能、[2]九大・生医研・分子免疫、[3]九大院・理・生体情報化学)

○Takashi WATANABE[1], Mika FUJITA[1], Takashi IMAI[2], Masahiro NAGATA[2], Motohiro TANI[3], Tomomi HONDA[1], Yoshimitsu KAKUTA[1], Yohei ISHIBASHI[1], Nozomu OKINO[1], Sho YAMASAKI[2], Makoto ITO[1] ([1]Faculty Agric., [2]Med. Inst. Bioreg., [3]Faculty Sci., Kyushu Univ.)

病原性真菌は、宿主免疫系から逃れることによって宿主に定着し、慢性感染を惹起こすがその分子機構に関しては不明な点が多い。病原性真菌 *Cryptococcus neoformans* の主要な糖脂質は、グルコシルセラミドとエルゴステリル-β グルコシド（EG）である。私達は、*C. neoformans* の EG 分解酵素(EGCrP2) を同定し、その欠損株が EG 蓄積に起因する増殖阻害及び液胞の異常を呈することを見出した (Watanabe *et al*, *JBC*, 2015)。最近、*C. neoformans* EGCrP2 欠損株は、野生株と比較してマウスに対する病原性とマウス体内での生存率が著しく低下し、$CD4^+$ T 細胞に依存しない免疫系によって排除されることが示唆された (Rella *et al*, *Front Microbiol*, 2015)。EGCrP2 欠損株が宿主内で排除されるメカニズムを解明するために、EGCrP2 欠損株で蓄積する EG が宿主免疫系を活性化する可能性を検討した。

自然免疫系で駆動する、種々の C 型レクチン発現細胞をパネル化したレポーターアッセイ系を用いて調べた結果、EG はヒト及びラット Mincle を特異的に活性化することが分った。しかし、今回調べた条件下ではマウス Mincle を活性化しなかった。Mincle は主としてマクロファージに発現している、FcRγ と共役した C 型レクチンである (Yamasaki *et al*, *Nature Immnunol*, 2008)。

EGCrP2 欠損株から抽出した粗糖脂質画分には、マウス Mincle を活性化する糖脂質が存在した。この糖脂質を精製し、構造を解析した結果、EG のグルコースに脂肪酸が 1 分子結合したアシル EG (AEG) と同定された。AEG の主要な脂肪酸種は 18:1 であったが、16:0、18:0、18:2 を構成脂肪酸とする AEG も存在した。Mincle レポーターアッセイにより、AEG はヒト Mincle のみならずマウス Mincle も活性化することが分かった。また、EG 及び AEG は、ヒト単球由来樹状細胞から炎症性サイトカインの１つである IL-8 の産生を誘導した。これらの結果から、病原性真菌の EG 及びその誘導体 AEG は Mincle を介して自然免疫系を活性化することが示された。

*C. neoformans* 野生株の培養温度を 30℃から 37℃（ヒト体温）に上げると、免疫賦活活性がある EG や AEG 量が一過的に増加したが、速やかに定常レベルに戻ることを見出した。一方、EGCrP2 KO 株では同条件下で EG と AEG 量が経時的に増加・蓄積するとともに、その一部は細胞外に漏出した。つまり、EGCrP2 は感染時に病原体の EG、AEG を分解する役割を担っていると考えられる。

以上の結果は、*C. neoformans* は EGCrP2 によって免疫賦活化糖脂質を分解することで宿主免疫系から逃避していることを示唆している。 本研究の一部は AMED-CREST の支援により実施された。

*Cryptococcus neoformans*, Ergosteryl glucoside, Innate immune system

講演番号：2J29a10
講演日時：3 月 18 日 11:45～ J 校舎 29 会場

# 養殖ヒトエグサから分離したラムナン硫酸の抗血液凝固活性

# Anticoagulant activities of the rhamnan sulfate isolated from commercially cultured Monostroma nitidum

○田幸 正邦[1,2]、山城 陽一[1]、上地 俊徳[1] ([1]琉球大農、[2]健康長寿科学研)
○Masakuni TAKO[1,2], Yohichi YAMASHIRO[1], Shuntoku UECHI[1] ([1]Univ. Ryukyus, [2]Health Longevity Res. Lab.)

演者らは先に、沖縄県で養殖により生産されているヒトエグサからラムナン硫酸の化学特性を明らかにして化学構造を推定した[1]。ここでは、本多糖の抗血液凝固活性について報告する。

**方法**：ヒトエグサは沖縄県北中城漁業協同組合から供与されたものを使用した。ラムナン硫酸の調製は常法によった。ラムナン硫酸を DEAE セファロースで分画して供試た。また、ギ酸で部分加水分解物を調製して供試した。対照としてヘパリン（硫酸含量 : 28.7%）についても測定を行った。抗血液凝固活性の測定は活性化部分トロンボプラスチン（ATPP)、トロンボプラスチン（PT）およびトロンボテスト（TT）で行った。

**結果**：カラムクロマトグラフィーによって 2 種類（フラクション A および B）の画分を得た。それらの硫酸含量は 12.4%および 27.8%であった。Native(硫酸含量,22.7%), フラクション A および B の APTT 活性はヘパリンの 77%に留まった。しかしながら、部分分解物 C2 のそれはヘパリンに比較して 107%を有した。Native, A および B の PT 活性はヘパリンに比較して高い活性を有した(120%)。また、TT 活性は硫酸含量に比例して高い活性を有した(B, 170%)。

文献
中村昌宏、山城陽一、小西照子、花城勲、田幸正邦：日本食品科学工学会誌、58, 245-251(2011).

Rhamnan sulfate, *Monostroma nitidum*, Anticoagulant activities

発表責任者：田幸正邦（tako@agr.u-ryukyu.ac.jp）

講演番号：2J29p01
講演日時：3 月 18 日 14:00～ J 校舎 29 会場

# ヒトゴルジ体β-ガラクトシダーゼの発見と *N*-結合型糖鎖修飾との関係

# Relationship of discovered human Golgi ß-galactosidase as *N*-glycan processing process

○三浦 一輝[1]、青山 結郁[2]、夏 夕利加[2]、袴田 航[1,2]、平野 貴子[2]、西尾 俊幸[1,2] ([1]日大院生資科、[2]日大生資科)
○ Kazuki Miura[1], Yuka Aoyama[2], Yurika Natsu[2], Wataru Hakamata[1,2], Takako Hirano[2], Toshiyuki Nishio[1,2] ([1]Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [2]Nihon Univ.)

【目的】タンパク質の翻訳後修飾の１つである *N*-結合型糖鎖修飾は、*exo* 型加水分解酵素と糖転移酵素によって行なわれている。*N*-結合型糖鎖修飾は小胞体から開始される。小胞体で糖鎖修飾が行われる基質の非還元末端はすべて α-結合で、*exo* 型に加水分解される。次のゴルジ体で行われる糖鎖修飾は、糖鎖の非還元末端が α-結合の場合 *exo* 型加水分解と糖転移の修飾がなされるが、β-結合の場合は糖転移のみである。そこで、非還元末端が β-結合の場合にも *exo* 型加水分解がなされると考え、ゴルジ体において *N*-結合型糖鎖の非還元末端の β-結合を *exo* 型に加水分解する “*exo* β-glycosidase” の探索とその翻訳後修飾における役割を解明することを目的とした。

ゴルジ体における *N*-結合型糖鎖修飾過程では、“*exo* β-glycosidase” の基質となる β-ガラクトシド結合および β-*N*-アセチルグルコサミニド結合が出現する。これらの構造が “*exo* β-glycosidase” により加水分解されていれば、ゴルジ体における新たな逆行修飾過程の発見となり、複雑な構造を有する *N*-結合型糖鎖の生合成調節への関与が強く示唆される。

【方法と結果】 *N*-結合型糖鎖修飾に関わる *exo* 型加水分解酵素の立体構造を解析し、その基質認識の特徴と *in silico* シミュレーションを用いて標的とする “*exo* β-glycosidase”、β-ガラクトシダーゼ（β-Gal）および β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ（β-GlcNAc）の細胞内活性イメージング可能な蛍光基質を精密分子設計し合成した。本蛍光基質をヒト細胞へ投与し標的酵素の活性イメージングを行った結果、ゴルジ体に新規な β-Gal 活性・リソソームに β-GlcNAc 活性を見出した。リソソーム β-GlcNAc は糖鎖分解に関わる既知の酵素であると考えられるが、ゴルジ体 β-Gal は全く新規な新規酵素活性であった。ヒト細胞の β-ガラクトシダーゼ (GLB1) は、リソソームに GLB1 isoform 1、核周辺に活性および機能が不明な GLB1 isoform 2 が報告されている。このことから、発見したゴルジ体 β-Gal 活性は GLB1 isoform 2 に由来することが示唆された。そこで、合成した蛍光基質および GLB1 抗体を用いて免疫染色を行った結果、発見した β-Gal 活性が GLB1 isoform 2 に由来することが強く示唆された。また、我々が以前報告したゴルジ体 β-アロシダーゼ活性 (*Bioorg. Med. Chem.*, 2015, **23**, 73-79) が GLB1 isoform 2 由来することも確認した。現在は、光アフィニティーラベル法により GLB1 isoform 2 の単離・同定を試みている。

上記試みにて、GLB1 isoform 2 が単離・同定できれば、新たな逆行修飾過程の発見となり、複雑な構造を有する *N*-結合型糖鎖の生合成調節機構解明へつながることが期待できる。

*N*-glycan processing, ß-galactosidase, ß-*N*-acetylglucosaminidase

発表責任者：袴田航（hakamata.wataru@nihon-u.ac.jp）

講演番号：2J29p02
講演日時：3 月 18 日 14:15～ J 校舎 29 会場

抗体糖鎖リモデリングに向けた EndoS2 D182X 変異体の解析
Analysis of EndoS2 D182X mutants for the use of glycoengineering of antibodies
○高島 晶[1]、大隅 賢二[1]、月村 亘[1]、森 昌子[1]、黒河内 政樹[1]、菅原 州一[1]、高柳 淳[2]、水野 真盛[1]、松田 昭生[1]、天野 純子[1]、白井 孝[1] ([1]（公財）野口研、[2]慶応大先導研 GSP)
○Shou Takashima[1], Kenji Osumi[1], Wataru Tsukimura[1], Masako Mori[1], Masaki Kurogochi[1], Shu-ichi Sugawara[1], Atsushi Takayanagi[2], Mamoru Mizuno[1], Akio Matsuda[1], Junko Amano[1], Takashi Shirai[1] ([1]The Noguchi Institute, [2]Dept. of Molecular Biology, Keio University School of Medicine)

一般に糖タンパク質には複数の糖鎖構造が結合してヘテロな集団となっているが、品質管理や機能向上のために、均一構造の糖鎖をもった糖タンパク質を作製する技術が注目されるようになってきた。抗体の場合、その Fc 領域に存在する *N*-結合型糖鎖は、抗体の機能発現に影響を与えることがあるため、抗体医薬品の開発においては、糖鎖改変による機能向上の取り組みがなされてきている。我々は抗体糖鎖の改変法として、エンドグリコシダーゼおよびその変異体を利用し、化学合成等によって調製した均一構造をもつ糖鎖を抗体に転移させる方法に着目して研究を進めている。*Streptococcus pyogenes* 由来の EndoS および EndoS2 は、抗体糖鎖を特異的に切断する酵素として知られている。本研究では、EndoS よりも広い基質特異性をもつ EndoS2 に関して変異体を作製し、その糖転移活性や糖鎖切断活性などの諸性質を調べ、グライコシンターゼとして抗体糖鎖のリモデリングに利用できるかについて検討することにした。

EndoS2 は GH18 ファミリーに属する酵素で、その活性部位には酸性アミノ酸残基によって構成された DxxDxDxE モチーフが存在する。EndoS はこのモチーフ内(D228～E235)にある D233 への変異導入で糖転移活性を有するグライコシンターゼに変換されており、EndoS2 でも対応する D184 への変異導入でグライコシンターゼに変換されることが報告されている(1)。一方、我々は D182 への変異導入でも EndoS2 がグライコシンターゼに変換されることを見出した。そこでどのようなアミノ酸置換がグライコシンターゼ化に適しているのか詳細に検討するため、D182X 変異体（X は任意のアミノ酸）を作製し、その糖転移活性をコアフコースが付加した IgG 抗体（ハーセプチン）と A2-オキサゾリン糖鎖を基質として、pH7.0、30℃の条件で調べた。その結果、X が C, H, L, M, N, Q, S, T, V といったアミノ酸の変異体は高い転移活性を示した。また X が A, E, G, I といったアミノ酸の変異体でも転移活性は高かったが、この場合は残存切断活性も高く、反応時間が長くなると、転移産物の切断が見られた。一方、X が F, K, P, R, W, Y といったアミノ酸の変異体では転移活性、切断活性ともに低かった。D184X 変異体でも、X が F, K, R, W といったアミノ酸の場合は転移活性、切断活性が同様に低下していたが、D184Y ではこれらの活性が維持されている(1)など、置換するアミノ酸によって、D182 と D184 では効果が異なる場合も見られた。D184X 変異体の中では、D184M がグライコシンターゼとして優れていることが報告されているが(1)、上記反応条件では、D182X 変異体の中にも転移活性が高いグループのように抗体糖鎖の改変に十分利用できるものがあった。

(1) Tiezheng Li et al. J. Biol. Chem. 291, 16508-16518 (2016)

antibody, glycoengineering, EndoS2

講演番号：2J29p03
講演日時：3 月 18 日 14:30～ J 校舎 29 会場

# Native な糖タンパク質のアスパラギン結合コンプレックス型糖鎖特異的糖鎖遊離酵素の存在様式とその性質

# Presentation and properties of endo-β-*N*-acetylglcucosaminidases specific for asparagine-linked oligosaccharides of complex type of native glycoproteins

高谷 尚弥、竹内 朋史、○伊藤 和央（阪市大院・理）
Naoyo TAKATANI, Tomohumi TAKEUCHI, ○Kazuo ITO (Grad. Sch. of Sci., Osaka City Univ.)

【目的】我々は、native な糖タンパク質からアスパラギン結合型糖鎖を容易に遊離するとともに糖鎖組換えに有用な新規エンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ生産菌を、ヒトなどの各種動物から探索し、その性質の解析と開発を行っている。これまでにヒトより分離した複数の *Prevotella* 属菌がアスパラギン結合型糖鎖のうちコンプレックス型糖鎖を native な糖タンパク質から容易に遊離する酵素を生産していることを発見し、これらの産生する酵素をそれぞれエンド PB、エンド Psp. およびエンド PM と命名した。そして、産生する酵素の性質を調べてきた。本研究では、そのうちの 1 つの *Prevotella* 属の産生する酵素を分離・精製し、その存在様式と性質を調べた。
【方法】糖タンパク質を基質として、糖鎖の遊離を電気泳動で調べた。遊離糖鎖や糖鎖転移生成物の分離・分析は、TLC および質量分析計によって行った。酵素の精製は各種カラムクロマトグラフィーによって行った。
【結果および考察】*Prevotella* 属の産生するエンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼはいずれも菌体に結合していた。また、培養ろ液中には遊離型の酵素が存在した。そのうち、エンド Psp. においては、菌体結合型酵素は可溶化後カラムクロマトグラフィーによって 3 の画分に分画された。これらは菌体膜結合型酵素で、いずれも native なヒトトランスフェリン、ヒトラクトフェリイン、ヒト IgG、ウシフェツインおよびヒト$\alpha_1$-酸性糖タンパク質から糖鎖を完全に遊離した。また、これら糖タンパク質に結合している糖鎖を受容体分子への転移する活性を示した。しかし、ウシ RNase B やオボアルブミンからの糖鎖遊離作用は認められなかった。一方、培養ろ液中の遊離型酵素はウシ RNase B やオボアルブミンからも糖鎖を遊離した。このため、菌体結合型酵素は糖タンパク質の種類や非還元末端側の Sia や biscecting GlcNAc あるいはコア Fuc の存在に関わらず、native な糖タンパク質からアスパラギン結合型糖鎖のうち 2、3 および 4 本鎖分岐のコンプレックス型糖鎖を遊離するとともに転移する酵素であった。一方、遊離型酵素はコンプレックス型糖鎖のみならずハイマンース鎖も糖タンパク質から遊離する酵素であった。これらの結果から、*Prevotella* sp. は菌体膜結合型と遊離型の存在様式の異なる 2 つのタイプのエンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼを産生しており、これらは糖鎖構造に対する特異性においても異なっているものと考えられた。また、これらの酵素は糖タンパク質に結合しているアスパラギン結合糖鎖の糖鎖操作に有用な酵素であると考えられた。

endo-β-*N*-acetylglucosaminidase PM, endo-β-*N*-acetylglucosaminidase PB, *Prevotella*

発表責任者：伊藤和央（ito@sci.osaka-cu.ac.jp）

講演番号：2J29p04
講演日時：3 月 18 日 14:45～ J 校舎 29 会場

*In vitro* 発現系を利用した Glycoside Hydrolase Family 47 の蛋白の調製
Preparation of proteins in Glycoside Hydrolase Family 47 by *in vitro* expression system
○相川 順一、伊藤 幸成 (理研)
○Junichi Aikawa, Yukishige Ito (RIKEN)

＜目的＞

アスパラギン結合型糖鎖(*N*-glycan)を持つ糖タンパク質は、粗面小胞体（ER）における品質管理機構により機能的なものが選別され、最終的に細胞外や細胞表層などに輸送される。一方、不適切な折りたたみをされたと判断された糖タンパク質は ER-associated degradation により、細胞質に移行し、その後分解される。ここで、ER における糖タンパク質の *N*-glycan はハイマンノース型であり、それらは Glycoside Hydrolase Family 47(GH47)に属する蛋白によっても認識されると考えられている。

そこで、本研究では、GH47 に属するタンパク質のうち、ER degradation-enhancing mannosidase-like protein (EDEM)がハイマンノース型 *N*-glycan を有する糖タンパク質と相互作用する機構を探求するため、まず組換え型 EDEM を調製することを目的とした。

＜方法＞

ヒト EDEM1 全長タンパク質中のマンノシダーゼ相同ドメインに、His tag（N 末）と Arg tag（C 末）を付加したポリペプチドを、大腸菌あるいは再構成型無細胞タンパク質合成系 PURE system により調整した。無細胞タンパク質合成系ではポリペプチドを含む反応液中に、detergent や osmolyte を加え、可溶性画分からの回収を試みた。さらに、可溶性画分に回収されたポリペプチドをアフィニティー精製した。

＜結果＞

既に ER α-mannosidase I の発現で実績のある大腸菌の系[1)]では、構築したポリペプチドを可溶性画分に回収することができなかった。さらにリフォールディング処理したが、得られたポリペプチドはマンノシダーゼ活性を示さなかった。

そこで、同じポリペプチドを無細胞タンパク質合成系により発現させた。予想される分子量のポリペプチドは不溶性画分に回収されたため、各種 detergent 及び osmolyte を添加し、不溶化の阻害を試みた。その結果、1 種の化合物によりポリペプチドが可溶性画分から回収された。得られたポリペプチドを TALON 磁気ビーズによる精製し、ビーズに保持された状態で回収した。現在、ポリペプチドが結合したビーズを用いて、糖鎖及び糖タンパク質を基質としたマンノシダーゼ活性の検出を試みている。

[1)] *Glycoconj. J.* **29**, 35-45 (2012); *J. Biochem.* **155**, 375-384 (2014)

Glycoside Hydrolase Family 47, *in vitro* expression, mannosidase

発表責任者：相川　順一（aikawa@riken.jp）

講演番号：2J29p05
講演日時：3 月 18 日 15:00～ J 校舎 29 会場

植物細胞壁ペクチン成分ラムノガラクツロナン I の生合成に関与するラムノース転移酵素の同定
Identification of rhamnosyltransferase involved in biosynthesis of pectic rhamnogalacturonan I in plant cell wall

○加藤 耕平[1]、竹中 悠人[1]、鶴浜 和奈[1]、柳生 健太[1]、竹田 篤史[1]、國枝 正[2]、西村 いくこ[2]、小川(大西) 真理[3]、松林 嘉克[3]、石水 毅[1] ([1]立命館大生命、[2]甲南大理工、[3]名大院理)
○Kohei KATO[1], Yuto TAKENAKA[1], Kana TSURUHAMA[1], Kenta YAGYU[1], Atsushi TAKEDA[1], Tadashi KUNIEDA[2], Ikuko NISHIMURA[2], Mari OGAWA-OHNISHI[3], Yoshikatsu MATSUBAYASHI[3], Tkeshi ISHIMIZU[1] ([1]College of Life Sciences, Ritsumeikan University, [2]Faculty of Science and Technology, Konan University, [3]Guraduate School of Science, Nagoya University)

植物細胞壁成分ペクチンは、12 種の単糖から構成される複雑な構造をした多糖である。その生合成には約 50 種類の糖転移酵素が関与しているとされているが、多くの糖転移酵素遺伝子は未同定である。ペクチン主要成分の一つであるラムノガラクツロナン I(RG-I)はラムノース(Rha)とガラクツロン酸(GalUA)の二糖繰り返し構造からなる主鎖を持つ。RG-I の生合成に関わり、Rha を RG-I 主鎖の非還元末端の GalUA に転移するラムノース転移酵素(RRT)遺伝子も未同定である。本研究では RRT の遺伝子同定を目的とした。

シロイヌナズナ種子では、RG-I を主成分とするムシレージが合成される。種子に発現している糖転移酵素遺伝子から、ムシレージ合成時に発現量が高くなること、反応様式が立体反転型の糖転移酵素であること、RG-I 主鎖の生合成に関与するガラクツロン酸転移酵素(RGT)とされる遺伝子と発現パターンが類似していることを指標に、RRT 候補遺伝子を選抜した。候補遺伝子についてタバコ BY-2 細胞を用いた異種細胞タンパク質発現系を構築した。蛍光標識化ラムノガラクツロナンオリゴ糖 8 糖をアクセプター基質として、UDP-Rha をドナー基質として用いて、発現タンパク質のラムノース転移酵素活性を検出した。これにより RG-I 生合成に関わる RRT 遺伝子を同定した。RRT 遺伝子は多くの器官で発現していたが、特にムシレージを含む器官での発現が高かった。また RRT 遺伝子は RG-I 生合成関連酵素遺伝子(UDP-Rha 合成酵素、RGT)と共発現していた。更に、同定した RRT はアミノ酸配列により分類される既知の糖転移酵素ファミリーと明確な相同性を示さず、新規糖転移酵素ファミリーを形成すると考えられた。

cell wall, glycosyltransferase, pectin

発表責任者：石水毅（ishimizu@fc.ritsumei.ac.jp）

講演番号：2J29p06
講演日時：3 月 18 日 15:25～ J 校舎 29 会場

# 遊離 N-グリカンのタンパク質フォールディング促進活性とアミロイド形成阻害活性

# Protein-folding promoting activity and amyloid-formation inhibitory activity of free N-glycans

○勝部 諒[1]、阿部 義人[2]、前田 恵[1]、田中 達也[1]、植田 正[2]、木村 吉伸[1] ([1]岡山大院・環境生命、[2]九大院・薬学府)
○Makoto KATSUBE[1], Yoshito ABE[2], Megumi MAEDA[1], Tatsuya TANAKA[1], Tadashi UEDA[2], Yoshinobu KIMURA[1] ([1]Okayama Univ., [2]Kyusyu Univ.)

**【背景•目的】**分化成長中の植物に遍在する遊離 *N*-グリカン（FNGs）の生理機能解明研究の途上，我々はハイマンノース型 FNGs（HMT-FNGs）が変性タンパク質の正常フォールディングを促進し，ミスフォールドタンパク質の凝集を阻害することを見出している[1,2]。そこで本研究では，HMT-FNGs が有するシャペロン様活性について詳細な構造・機能相関解析を行った。

**【方法】**FNGs のシャペロン様活性測定には，AL アミロイドーシスの原因タンパク質である抗体 L 鎖可変部領域 vλ6 の変異体（3Hmut.Wil）をモデルタンパク質として用いた。FNGs は，雑豆貯蔵タンパク質あるいはローヤルゼリータンパク質（ハイマンノース (HMT) 型; $Man_{9\text{-}6}GlcNAc_2$ (GN2 型), $Man_{9\text{-}6}GlcNAc_1$ (GN1 型)[3,4]，銀杏種子貯蔵タンパク質（植物複合型）[5] 及び卵黄糖ペプチド（動物複合型）から精製し，構造均一性を確認した後に使用した。FNGs のシャペロン様活性は，FNGs 添加による変性 3Hmut.Wil の $^{1}H\text{-}^{15}N$ HSQC スペクトル変化を指標に解析した。一方，FNGs のアミロイド形成抑制効果については，アミロイド繊維に特異的に結合する蛍光プローブ (Thioflavin T) を用いて，FNGs 添加によるアミロイド形成量変化を測定した。

**【結果】** (1) GN2 型 HMT-FNGs の添加により，変性 3Hmut.Wil は FNGs 濃度依存的にネイティブ構造へとフォールディング誘導されたことから，GN2 型 HMT-FNGs がシャペロン様活性を持つことが明らかとなった。一方，GN1 型 HMT-FNGs も変性 3Hmut.Wil のフォールディングを誘導したが，活性は GN2 型に比べて弱いものであった。それに対して，植物複合型 FNGs 及び動物複合型 FNGs はシャペロン様活性を殆ど示さなかった。（2）GN1，GN2 型 HMT-FNGs は，いずれもネイティブ構造の 3Hmut.Wil に結合することが確認できたが，FNGs 結合による 3Hmut.Wil の構造変化も GN2 型が顕著であり，GN2 型 HMT-FNGs の方がネイティブ 3Hmut.Wil により強く結合し，その構造を安定化していることが推察された。（3）FNGs のアミロイド形成抑制活性は，GN1 型 HMT-FNGs，GN2 型 HMT-FNGs ともに確認されたが，GN2 型 HMT-FNGs がより低濃度でアミロイド形成を抑制した。それに対して，植物複合型 FNGs はアミロイド形成抑制活性を有していなかったが，シアル酸含有のバイアンテナ型 FNGs は，アミロイド形成をむしろ促進することが明らかになった。[1] Tanaka, T., *et al.*, *Glycoconj. J.* 32, 193, (2015). [2] 田中ら 日本農芸化学会 2015 年度大会 講演要旨集 p707. [3] Kimura, M., *et al. Biosci. Biochem. Biotechnol.* 74, 155-158 (2011), [4] Kimura, Y., *Biosci. Biochem. Biotechnol.* **64**, 2109-2120 (2000) [5] Maeda, M., *et al., Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 78, 276-278 (2014).

free N-glycan, protein folding, N-glycan function

講演番号：2J29p07
講演日時：3 月 18 日 15:40～ J 校舎 29 会場

# 酸性 PNGase 遺伝子を完全にノックアウトした *A.thaliana* 中の PNGase 活性と遊離 *N*-グリカンの構造特性

# PNGase activity and structural features of free *N*-glycans in *A.thaliana*, in which the gene encoding acidic PNGases are completely knocked-out

○上村 亮太[1]、前田 恵[1]、秋山 剛[1]、三﨑 亮[2]、藤山 和仁[2]、木村 吉伸[1]（[1]岡大院環境生命、[2]阪大国際交流セ）
○ Ryota UEMURA[1], Megumi MAEDA[1], Tuyoshi AKIYAMA[1], Ryo MISAKI[2], Kazuhito FUJIYAMA[2], Yoshinobu KIMURA[1] ([1]Okayama Univ., [2]Osaka Univ.)

【目的】植物細胞中で新生糖タンパク質は，小胞体内でフォールディングを受けた後，ゴルジ装置へと輸送される。糖タンパク質上の糖鎖はゴルジ装置中で複合型構造へとプロセッシングを受け，成熟タンパク質として液胞，細胞膜，細胞外スペースへと輸送され，それぞれの機能を果たす。その後，役目を終え機能を失った糖タンパク質は代謝分解を受ける。機能不全糖タンパク質のプロテアーゼ分解により糖ペプチドが生成されると，植物に特徴的な酸性ペプチド: *N*-グリカナーゼ（aPNGase）によりアスパラギン結合型糖鎖（*N*-グリカン）を遊離させることで，ペプチド鎖の分解を促進させると考えられている。一方，生成した遊離 *N*-グリカン (FNGs) は胚軸の伸長促進活性など植物の分化生長に関わるシグナル分子としての機能が想定されている [1]。我々は既に，aPNGase 過剰発現トマトを構築し，遊離糖鎖の増加と酵素活性の顕著な上昇を確認すると共に，過剰発現体トマトでは果実成熟速度が速まることを報告している[2,3]。しかしながら，詳細な分子メカニズムには不明な点が多い。本研究では, aPNGase 候補遺伝子を 2 種類（*At3g14920*, *At5g05480*）有する *A.thaliana* に着目し，aPNGase 候補遺伝子の二重欠損体の構築を行い，（1）aPNGase 活性測定検定，（2）FNGs 構造解析を行った。
【方法・結果】（1）*A.thaliana* 野生株と二重欠損株の葉を液体窒素中で破砕後，50 mM 酢酸アンモニウム（pH 8.0）で抽出し，透析を行った。透析内液を粗酵素液とし，動物複合型 *N*-グリカン含有ペプチドを基質として反応させ，生成した FNGs をピリジルアミノ化により蛍光標識した後，非還元末端に結合しているシアル酸を除去するためにシアリダーゼ消化を行った。その後，植物由来の *N*-グリカンには存在しないβ1,4Gal 残基特異的な RCA120 アフィニティカラムに供して PA 糖鎖を溶出し，逆相 HPLC により反応生成物の解析を行った。その結果，二重欠損体における aPNGase 活性の消失が確認された。
（2）野生株と二重欠損株の地上部を液体窒素中で破砕後，0.1 N アンモニア水で抽出し，透析を行った。透析外液に回収されたオリゴ糖画分を陽イオン交換，陰イオン交換，ゲルろ過に供することで FNGs を精製した。FNGs をピリジルアミノ化により蛍光標識し，逆相 HPLC, 順相 HPLC により FNGs を分離後，MS，MS/MS 分析及び酵素消化法により構造解析を行った。その結果，二重欠損体における FNGs 量の顕著な減少が確認された。以上の結果から，2 種の aPNGase 候補遺伝子は，aPNGase をコードしており，FNGs の生成に関与していることが明らかになった。

[1] Priem, B., et al., *Plant Physiol.*, **98**, 399-401, (1992). [2] Hossain, A., *et al.*, *J. Biochem.* **147**, 157-165, (2010). [3] Fujikawa, M., *et al.*, *Glycoconj. J.*, **32**, 195 (2015)

free *N*-glycans, aPNGase, *A.thaliana*

発表責任者：上村亮太（ptrc1zag@s.okayama-u.ac.jp）

講演番号：2J29p08
講演日時：3 月 18 日 15:55～ J 校舎 29 会場

# Diverse subcellular localization of the insect CMP-sialic acid synthetases

○Di Wu[1,2,3], Akiko Fujita[1], Chihiro Sato[1,2,3], Ken Kitajima[1,2,3] ([1]Nagoya Univ. BBC, [2]Nagoya Univ. Grad. Sch. Bioagr. Sci., [3]Nagoya Univ. IGER-GNS)

The occurrence and biological importance of sialic acid (Sia) and its metabolic enzymes in insect have been studied using *Drosophila melanogaster* (fruit fly). The most prominent feature of *Drosophila* CMP-Sia synthetase (DmCSS) is its Golgi-localization, compared with nuclear localization of vertebrate CSSs. However, it remains unclear whether the Golgi-localization is common to other insect CSSs and why it happens. To answer these questions, *Aedes aegypti* (mosquito) CSS (AaCSS) and *Tribolium castaneum* (beetle) CSS (TcCSS) were cloned and characterized for their enzyme activity and subcellular localization. Our new findings show: (1) AaCSS and TcCSS were found to share the common overall structure with DmCSS in terms of evolutionarily conserved motifs and the absence of the C-terminal domain typical to mammalian CSSs. (2) AaCSS and TcCSS show *in vivo* and *in vitro* CSS activities, when expressed in mammalian and insect cells. When expressed in bacteria, they did not show any activity until the N-terminal hydrophobic region was removed. (3) Surprisingly, all the insect CSSs are mainly secreted to the culture medium; however, small populations of AaCSS and TcCSS are also localized in the ER, but not in the Golgi where a certain population of DmCSS is usually localized. Our results suggest that the N-terminal hydrophobic regions of AaCSS and TcCSS function as a signal peptide to render them soluble in the ER, while that of DmCSS functions as a membrane-spanning region of type II transmembrane protein whose cytosolic KLK sequence functions as an ER export signal. AaCSS and TcCSS do not contain the corresponding sequences to the ER export signals. Accordingly, the subcellular localization of insect CSSs is much more diverse than previously recognized.

CMP-sialic acid synthetase, insect, sialic acid

講演番号：2J29p09
講演日時：3 月 18 日 16:10～ J 校舎 29 会場

# 大腸菌膜タンパク質の膜挿入機構解明に向けた糖脂質 MPIase 部分構造の合成

# Synthesis of partial structure of MPIase for elucidating mechanism on membrane protein integration of *E. coli.*

○藤川 紘樹[1]、西山 賢一[2]、島本 啓子[1] ([1](公財)サントリー生有研、[2]岩手大農)
○Kohki Fujikawa[1], Ken-ichi Nishiyama[2], Keiko Shimamoto[1] ([1]SUNBOR, [2]Iwate Univ.)

【目的】膜タンパク質は、全ての生物の細胞膜に存在しており、受容体、トランスポーター、イオンチャンネル、酵素などとして、細胞内外の情報伝達や代謝物の輸送など基本的な生命現象に深く関与している。近年、我々は大腸菌内膜における膜タンパク質挿入に必須の因子として、新規な糖脂質MPIase (Membrane Protein Integrase)を発見した(1)。MPIaseは、*N*-アセチル-4-アミノフコース(Fuc4NAc)、*N*-アセチルマンノサミンウロン酸(ManNAcA)、*N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)の3種のアミノ糖からなるユニットが10回程度繰り返された糖鎖構造に、脂質ジアシルグリセロールがピロリン酸を介して結合した構造を持ち、そのGlcNAcの6位水酸基は部分的に*O*-アセチル(Ac)化されていた(2)。これまでに我々は、MPIaseの最小活性構造、および膜タンパク質膜挿入機構の解明を目的に、MPIaseの最小単位である3糖ピロリン脂質の化学合成を報告してきた。本研究では、新たにGlcNAcの6位水酸基のAc化や糖鎖の伸長反応に対応した3糖ピロリン脂質[mini-MPIase (1)]の化学合成を行ったので報告する。

【方法及び結果】MPIaseの合成上の課題として、①Fuc4NAcユニットの合成、②ManNAcAユニットの合成、③β-マンノサミニド結合の構築、④糖鎖還元末端へのピロリン脂質の導入などが考えられた。①FucNAcユニットの合成では、D-グルコースから出発して、6位の還元、4位水酸基の立体反転などを経て、Fuc4Nドナーを合成した。②ManNAcAユニットの合成、および③β-マンノサミニド結合の構築では、GlcドナーとGlcNAcアクセプターの縮合反応で得られた2糖[Glcβ(1,4)GlcNAc]のグルコース2位水酸基を立体反転することで、マンノース型へと導いた。得られた2糖をアクセプターへと変換後、Fuc4Nドナーとの縮合反応によって、3糖構造を得た。3糖の構築後、ManN6位水酸基の酸化、GlcNAc6位水酸基のAc化、アジド基のアセトアミド基への変換、糖鎖還元末端アリル基の脱保護を経て、3糖ヘミアセタール体を合成した。④糖鎖還元末端へのピロリン脂質の導入では、3糖ヘミアセタール体のリン酸化を行い、ジアシルグリセロールを含んだフォスフォロアミダイトと縮合することで、3糖ピロリン脂質を得た。最終脱保護を行うことで、GlcNAc6位にAc基を有するmini-MPIase (1)の合成を達成した。

【参考文献】
(1) Nishiyama K. et al. *J. Biol. Chem*, **2006**, *281*, 35667-35676.
(2) Nishiyama K. et al. *Nat Commun*, **2012**, *3*, 1260.

Glycolipid, Membrane Protein Integrase

講演番号：2J29p10
講演日時：3 月 18 日 16:25～ J 校舎 29 会場

# 化学合成標品を用いたタンパク質膜挿入に関与する糖脂質酵素 MPIase の構造と機能の解析

# Analysis of structure and function of MPIase, a glycolipozyme involved in membrane protein integration, by means of synthesized samples

○池田 汐里[1]、藤川 紘樹[2]、島本 啓子[2]、西山 賢一[1]([1]岩手大学、農学部、[2]サントリー生命科学財団、生物有機科学研究所)
○Shiori IKEDA[1], Kohki FUJIKAWA[2], Keiko SHIMAMOTO[2], Kenichi NISHIYAMA[1] ([1]Iwate Univ., [2]Suntory Foundation for Life Sciences)

膜タンパク質はシグナル伝達や、物質の輸送チャネルなど、多くの生命現象に重要な役割を果たしている。膜タンパク質は細胞質で生合成された直後に細胞膜へ挿入される。膜挿入反応は通常 SR、SRP、SecYEG などの膜挿入因子の作用により進行する。一方、分子量の小さい膜タンパク質は、自発的に膜挿入すると考えられていたが、近年、膜挿入に必要な因子として同定された糖脂質 MPIase の作用により膜挿入することが示された。MPIase は、糖脂質でありながら膜挿入反応を触媒するため「糖脂質酵素」という概念を提唱している。MPIase の糖鎖は、4 デオキシ 4 アセトアミドフコース、*N*-アセチルマンヌロン酸、*N*-アセチルグルコサミンの 3 種のアミノ糖が約 n=10 回繰り返されており、*N*-アセチルグルコサミンの約半分は *O*-アセチル化されている。この糖鎖が、ピロリン酸を介してジアシルグリセロールに連結されている。

MPIase の構造と機能の関係を詳細に調べるため、3 糖ユニットが一つと、ピロリン酸、ジアシルグリセロールから成る、mini-MPIase (1)を合成し、その膜挿入活性を調べた。リポソームに野生型 MPIase と mini-MPIase (1)を、それぞれ同じ重量で組み込んだ。Pf3 ファージのコートタンパク質変異体 3L-Pf3 coat を基質に用いて膜挿入活性を測定した。その結果、mini-MPIase (1)では、野生型 MPIase の 2 割程度の膜挿入活性が観察された。一方、*N*-アセチルグルコサミンの *O*-アセチル基を除去すると、膜挿入活性は喪失した。また、mini-MPIase (1)を膜挿入反応中に大量に加えると、野生型 MPIase の 6 割程度の活性が観察されたが、*O*-アセチル基を除去したとき、膜挿入活性は野生型 MPIase の 2 割程度まで大幅に減少した。

以上の結果より、MPIase 糖鎖長が短くても、十分な量があれば、膜挿入活性が発現することが明らかとなった。また、*N*-アセチルグルコサミンの *O*-アセチル基が膜挿入において重要な働きをしていることが再確認された。このことは MPIase のアセチル基と膜タンパク質が直接相互作用することを支持する。

membrane protein integration, glycolipozyme, liosomes

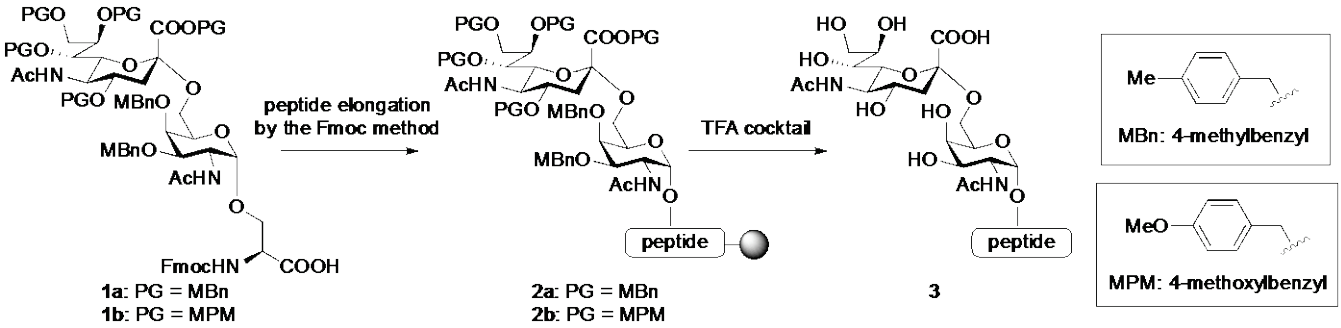
発表責任者：池田汐里（a8213001@iwate-u.ac.jp）

講演番号：2J29p11
講演日時：3 月 18 日 16:50～ J 校舎 29 会場

TFA 感受性保護基を用いたシアリル糖ペプチドの合成
Synthesis of sialylglycopeptide using TFA-labile protecting groups
○竹田 直樹、武居 俊樹、朝比奈 雄也、北條 裕信（阪大蛋白研）
○NAOKI TAKEDA, TOSHIKI TAKEI, YUYA ASAHINA, HIRONOBU HOJO (Inst. Protein Res. Osaka Univ.)

糖タンパク質合成の際、ラセミ化の防止、また前駆体である糖ペプチドチオエステルの調製の観点から、糖鎖保護基は酸性条件下での脱保護が好ましい。しかし強酸条件下での脱保護においては、糖鎖構造が複雑になると糖鎖が分解する問題がある。我々は４−メチルベンジル基（MBn）がペプチド側鎖の脱保護に用いるトリフルオロ酢酸（TFA）により脱保護可能であることを見出し、これを用いることでコア１型２糖を有する糖ペプチドチオエステルの合成に成功している [1]。今回はこの手法を用いてシアリル糖ペプチドチオエステルの調製を試みることとした。α-シアリル結合は糖鎖の中でも酸に不安定であるため、TFA で脱保護できる保護基の使用は、合成戦略において有効な手段となる。そこでシアリル糖タンパク質として代表的な MUC1 をターゲットとした合成検討を行った。

無保護のシアル酸を出発原料として、MBn 保護した後、*N*-アセチルグルコサミン誘導体との$\alpha$–選択的グリコシル化反応により２糖を合成した。この２糖とセリン誘導体との縮合により、糖セリン誘導体 **1a** を得た後、Fmoc ペプチド固相合成法により糖ペプチド **2a** を調製した。このペプチドに対し TFA 処理を行ったところ、完全脱保護体 **3** のみならず、シアル酸が脱落した脱シアリル体、および MBn 基が一つ残存するペプチドなどの副生成物も観測された。種々の検討の結果、脱保護中間体の MBn 基の残存が脱シアリル化を促進することが予想された。このためシアル酸上の脱保護をより速くすることが解決策となると考え、さらに酸感受性が高い４−メトキシベンジル基（MPM）を用いて同様の検討を行った。その結果、脱シアリル体の生成は大幅に減少し、目的の糖ペプチドを効率的に得ることに成功した。現在はシアリル糖ペプチドチオエステルの調製と、それに続くライゲーション反応を検討中である。




[1] Asahina, Y., Fujimoto, R., Suzuki, A., Hojo, H. (2015) *J. Carbohydr. Chem.*, **34**, 12-17.

sialylglycopeptide, TFA-labile protecting group, glycopeptidethioester

講演番号：2J29p12
講演日時：3 月 18 日 17:05～ J 校舎 29 会場

# 直行型チオエステル化素子を利用したヒトヒストン H4 の化学合成

# Chemical synthesis of human histone H4 using two orthogonal thioesterification devices

○朝比奈 雄也、川上 徹、北條 裕信（阪大蛋白研）
○Yuya Asahina, Toru Kawakami, Hironobu Hojo (Inst. Protein Res., Osaka Univ.)

真核生物の DNA は、ヒストンコアに巻きついたヌクレオソーム構造をとり、核内に存在している。ヒストンコアは、ヒストン H2A, H2B, H3, H4 の 4 種類のタンパク質から構成され、様々なアミノ酸残基に修飾を受けて機能している。修飾内容は、セリン、スレオニンのリン酸化、リシン、アルギニン側鎖のメチル化、アセチル化などである。これら修飾は、ヌクレオソームの構造を変化させ、遺伝子転写を可逆的、かつ特異的に制御している。近年、ヒストンのセリン残基に *O*-β-*N*-アセチルグルコサミンの付加が、リン酸化と競合して行われていることが報告され、この糖鎖付加の意味や機能解析が望まれている[(1)]。しかし、修飾部位が多数存在するヒストンを均一な形で天然から得ることは、極めて困難である。そこで本研究では、糖鎖構造を含め、均一な翻訳後修飾を持つヒストン H4 の合成を見据え、まずは、無修飾 H4 のポリペプチド鎖の効率的合成経路を確立することにした。

全長 102 残基を３つのセグメント（１−３７），（３８−６８）、（６９−１０２）に分け、それぞれを固相法により調製し、ペプチド縮合法の一種であるネイティブケミカルライゲーション（NCL）法によって各セグメントを縮合することにより、目的のポリペプチド鎖を構築することにした。H4 には、NCL 反応の足場となる Cys 残基が存在しないため、脱硫法を利用することにした[(2)]。そのため、セグメント調製時に、$Ala^{38,69}$ を Cys 残基に置換して合成し、縮合に利用した後に脱硫することで、元の Ala 残基を復元することにした。また、NCL 反応では、我々が開発したチオエステル化素子である cysteinylprolyl ester[(3)]（CPE）と *N*-alkylcysteine[(4)]（NAC）を組み合わせて使用することを、新たに試みた。これら 2 種の素子は、直交した pH 条件下で縮合反応を選択的に進行させることが可能である。この特性を利用することで、中間体の精製工程を回避し、３つのセグメントをワンポットで収率良く縮合することに成功した。得られた全長ペプチドを、脱保護と脱硫処理することで、目的の無修飾 H4 が効率良く得られた。今後は、このルートを元に、GlcNAc 付きヒストン H4 の合成を行う予定である。

参考文献

1) Hart, G. W. *et al. Nature*, **2007**, *446,* 1017-1022.
2) Wan, Q. and Danishefsky, S. J., *Angew. Chem. Int. Ed.,* **2007**, *46,* 9248-9252.
3) Kawakami, T. and Aimoto, S., *Chem. Lett.,* **2007**, *36,* 76-77.
4) Hojo, H., *et al. Tetrahedron Lett.,* **2007**, *48,* 25-28.

histone, native chemical ligation (NCL), orthogonal thioesterification devices

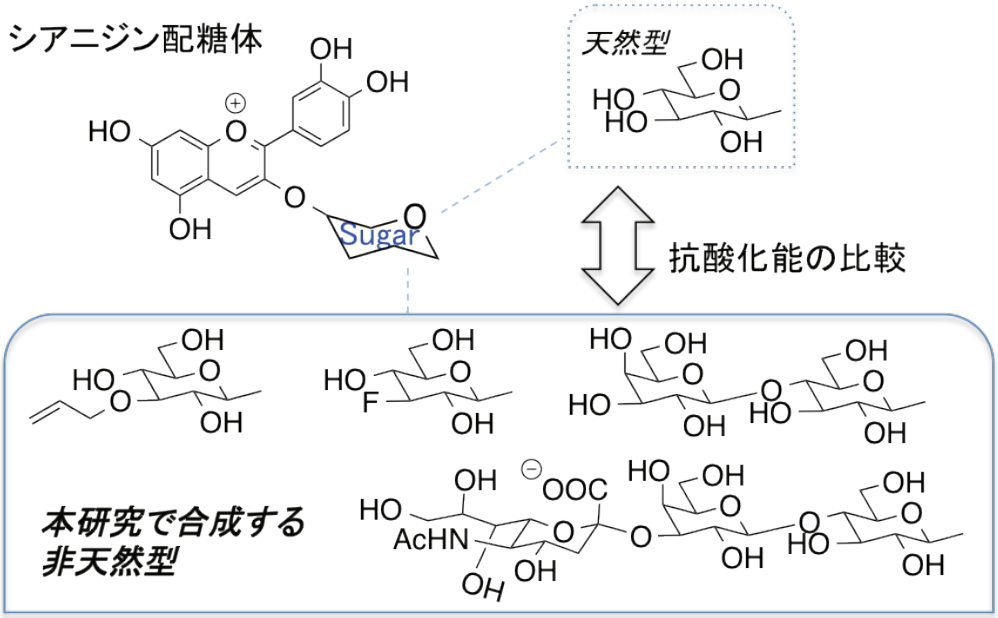
講演番号：2J29p13
講演日時：3 月 18 日 17:20～ J 校舎 29 会場

# 非天然型シアニジン配糖体の合成および抗酸化能の評価
# Synthesis and evaluation of antioxidant activity of unnatural cyanidin glycosides

○吉村 弥生、齋藤 隆行、松尾 一郎（群馬大院理工）
○Yayoi YOSHIMURA, Takayuki SAITO, Ichiro MATSUO (Gunma Univ.)

シアニジンはブルベーリー等の植物に存在するアントシアニンの１種であり、抗酸化作用やがん細胞成長抑制作用等多くの生理活性が確認されている。天然には多くの配糖体型シアニジンが存在し、分子中の糖分子が生物活性の向上や分子の安定性に寄与していることが確認されている。そこで、本研究では、化学的手法、化学-酵素的手法により天然型とは異なる糖分子が導入された非天然型のシアニジン配糖体を合成し、その抗酸化能について天然型シアニジンと比較することとした。

非天然型シアニジン配糖体として、ラクトース、シアリルラクトース、３位水酸基がアリル基もしくはフッ素原子で置換されたグルコースが導入された計4種類を設定した。既報[1]のシアニジン配糖体の化学合成法を参考に(+)-Catechin誘導体に各種糖残基をグリコシル化反応により導入した後、シアニジン骨格へと変換した。また、シアル酸の導入はシアル酸転移酵素を利用した。得られた化合物に関して、ORAC法により抗酸化能を天然物であるシアニジンおよびシアニジン-3-グルコシドと比較したところ、糖残基の種類により抗酸化能の違いが確認された。




[1] Kondo T. et al., *Organic Lett.*, 2006, 8, 3609-3612.

cyanidin, glycoside, antioxidant activity

発表責任者：吉村　弥生（yayoi20@gunma-u.ac.jp）

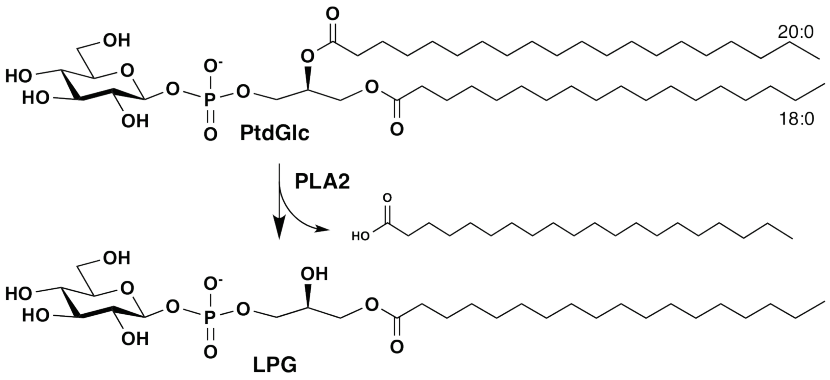
講演番号：2J29p14
講演日時：3 月 18 日 17:35～ J 校舎 29 会場

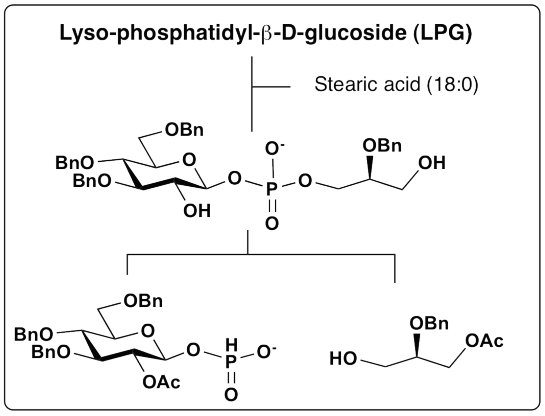
# リゾホスファチジルグルコシドの合成研究

# Total synthesis of Lyso-phosphatidyl-ß-D-glucoside

○松尾 一郎、大山 純平、齊藤 祥吾、鈴木 靖明、吉村 弥生（群馬大院理工）
○Ichiro Matsuo, Jyunpei Ohyama, Shogo Saito, Yasuaki Suzuki, Yayoi Yoshimura (Gunma Univ.)

リゾホスファチジルグルコシド（LPG）は，ホスファチジルグルコシド(PtdGlc)のグリセロール部分 sn-2 位のアラキジン酸がホスホリパーゼ A2（PLA2）により消化されることで生じる水溶性脂質メディエーターであり，ニューロン成長円錐に働いて神経細胞の反発応答に関与していることが知られている[1,2]。しかし，LPG のレセプター探索や，LPG のさらなる機能解明には，十分量のサンプルが必要不可欠であるが，LPG は生物試料中にはごく微量にしか存在せず，単離は困難である。また，合成法も報告されているものの，PtdGlc を化学合成した後に，PLA2 によるアシル基切断を経る酵素化学的な手法であり，その合成量はマイクログラムスケールにとどまっていた[2]。そこで，LPG の脂質メディエーターとしての機能解明に必要十分量のサンプルを供給することを目的に LPG の全合成研究に取り組んだ。本発表では LPG の合成と得られた LPG の pH 安定性などを検討した結果について報告する。




[1] Nagatsuka Y, Hirabayashi Y, *et al.*, *FEBS Lett*, 497, 141-147 (2001)
[2] GUY AT, Hirabayashi Y, Kamiguchi H, *et al.*, *Science*, 349, 974-977 (2015)

Lyso-phosphatidyl-ß-D-glucoside, PLA2, Synthesis

発表責任者：松尾一郎（matsuo@gunma-u.ac.jp）

講演番号：2J29p15
講演日時：3 月 18 日 17:50～ J 校舎 29 会場

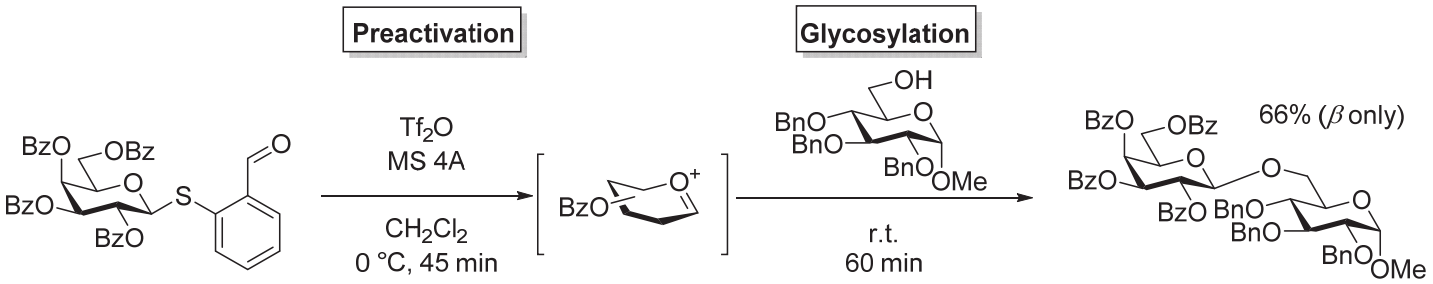
# 脱離基中にアルデヒドを持つチオグリコシド型糖供与体の反応挙動

# Reaction behavior of thioglycosyl donors having aldehyde in the leaving group

○堺 英俊[1]、小室 晴香[2]、西田 芳弘[1,3]、土肥 博史[2,3] ([1]千葉大院融合、[2]千葉大院園芸、[3]千葉大・分子キラリティー研究センター)
○Hidetoshi SAKAI[1], Haruka KOMURO[2], Yoshihiro NISHIDA[1,3], Hirofumi DOHI[2,3] ([1]Graduate School of Advanced Integration Science, Chiba Univ., [2]Graduate School of Horticulture, Chiba Univ., [3]Molecular Chirality Research Center, Chiba Univ.)

糖鎖の効率的合成において、グリコシル化反応時に特定の脱離基を化学選択的に活性化することは重要である。チオグリコシドは高い化学的安定性と化学選択性を持つことから、ハロゲン糖やイミデート体などと組み合わせて連続的グリコシル化に幅広く用いられている。ゆえに従来のチオグリコシドに影響を与えずに活性化できるチオグリコシドは、連続的グリコシル化において化学的に安定な新しい糖供与体として期待できる。その一方で、我々はチオサリチルアルデヒド型グリコシドが、通常のチオグリコシドは活性化されない TMSOTf のみによって活性化できることを見出した。本研究では糖鎖合成におけるチオサリチルアルデヒド型グリコシドの利便性および適用範囲の拡大を目的として、1,2-*trans* グリコシドの構築に有用と考えられるベンゾイル基で保護されたチオグリコシドを合成し、グリコシル化におけるプロモーター感受性や反応挙動を調べた。

チオサリチル酸のカルボキシル基を還元し、生じたアルデヒドを環状アセタールで保護することでチオサリチルアルデヒド誘導体を得た。これとガラクトシルブロミドを反応させてから保護基の変換を行うことで、目的とするベンゾイル保護されたチオサリチルアルデヒド型グリコシドを得た。このチオグリコシド対して様々なプロモーターや糖受容体を用いてグリコシル化反応を行ったところ、一級水酸基を持つ糖受容体に対して $Tf_2O$ を用いて室温で反応させると 44%の収率で対応する 1,2-*trans* 型二糖を与えた。副反応としてチオグリコシド同士の自己縮合が観察されたため、反応収率の向上を目的としてチオグリコシドを活性化してから糖受容体を系中に加える条件を検討したところ、preactivation を 0 ºC で 45 分行うことで収率が 66%まで向上した。




Glycosylation, Oligosaccharide, Stereoselectivity

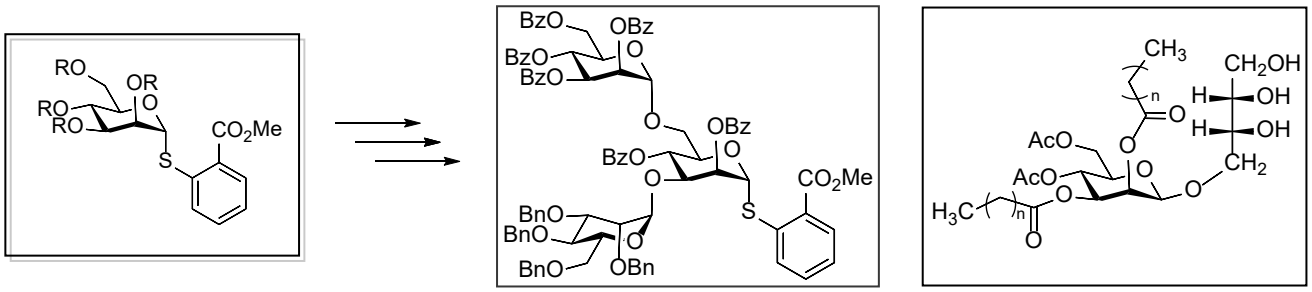
講演番号：2J29p16
講演日時：3 月 18 日 18:05～ J 校舎 29 会場

# チオサリチル酸メチルグリコシドを用いたマンノシル化に関する研究

# Mannosylation using thiomannoside having methyl thiosalicylate as a leaving group

○佐々木 リサ[1]、大野 勇次[2]、西田 芳弘[1,3]、土肥 博史[2,3] ([1]千葉大院融合、[2]千葉大院園芸、[3]千葉大・分子キラリティー研究センター)
○Risa SASAKI[1], Yuji OHNO[2], Yoshihiro NISHIDA[1,3], Hirofumi DOHI[2,3] ([1]Graduate School of Advanced Integration Science, Chiba Univ., [2]Graduate School of Horticulture, Chiba Univ., [3]Molecular Chirality Research Center, Chiba Univ.)

【背景・目的】自然界には数多くのマンノース含有糖鎖が存在しており、生命活動において重要な役割を果たしている。一方で当研究室では、様々なチオサリチル酸メチルグリコシドを合成し、これらが悪臭を伴うことなく調製可能であり、従来のチオグリコシドと同様に糖鎖合成に有用であることを報告してきた。本研究ではチオサリチル酸メチルグリコシドをマンノシル化に展開することを目的として、チオサリチル酸メチルマンノシドを新たに調製し、その反応性と立体選択性を評価した。得られた知見をもとに、チオサリチル酸メチルマンノシドを用いたマンノース含有生理活性糖鎖の合成を検討した。
【方法・結果】ペンタアセチルマンノースとチオサリチル酸メチルを用いて酸性条件下でグリコシド化を行い、糖部分の保護基を変換することで各種チオサリチル酸メチルマンノシドを得た。これらを用いて反応温度や溶媒を変えながらグリコシル化反応を行った結果、ベンジル基で保護したものは一級水酸基を用いると低温下で α 体が優先的に生成し、逆に二級水酸基を用いた場合は反応温度が下がるにつれて α 選択性が減少した。また、エステルで保護したものを用いると全ての条件で α 体のみが生成することがわかった。続いて armed/disarmed コンセプトをチオサリチル酸メチルマンノシドに適用可能かを検討するために、ベンジル保護およびベンゾイル保護されたチオサリチル酸メチルマンノシドをそれぞれ合成してグリコシル化を行ったところ、ベンジル保護されたもののみが化学選択的に活性化されてハイマンノース型糖鎖のコア三糖骨格を構築できた。現在チオサリチル酸メチルマンノシドを用いて、酵母や納豆菌などが生産するバイオサーファクタントであるマンノシルエリスリトールリピッド（MEL）とその異性体の合成を検討している。




Glycosylation, Oligosaccharide, Mannosyl erythritol lipid

発表責任者：土肥博史（hdohi@faculty.chiba-u.jp）

講演番号：2J30a01
講演日時：3 月 18 日 09:20～ J 校舎 30 会場

ダイズ ERO1a は分子内ジスルフィド結合の還元により活性が制御される
Soybean ERO1a is activated by the reduction of intramolecular disulfide bonds
○松崎 元紀、成尾 由理香、廣瀬 明歩、奥田 綾、小石原 克典、増田 太郎、裏出 令子（京大院農・農学）
○ Motonori MATSUSAKI, Yurika NARUO, Akiho HIROSE, Aya OKUDA, Katsunori KOISHIHARA, Taro MASUDA, Reiko URADE (Kyoto Univ.)

**【背景と目的】**真核細胞の小胞体では，新生ポリペプチド鎖の多くが分子内ジスルフィド結合形成をともなってフォールディングされる．この酸化的フォールディングの主要経路は Endoplasmic reticulum oxidoreductin-1 (Ero1) - Protein Disulfide Isomerase (PDI)経路であり，新生ポリペプチド鎖のジスルフィド結合形成反応を触媒することで酸化型から還元型となった PDI ファミリーの活性中心は，Ero1 によって酸化されることで再びジスルフィド結合形成触媒活性を回復する．この経路において，フォールディングを妨げる PDI ファミリーの過剰な酸化や酸化に伴う $H_2O_2$ の過剰な生成を防ぐため，Ero1 の活性は厳密に制御されなければならない．本研究では，ダイズ Ero1(GmERO1a)の活性制御の分子機構を解明することを目的に，GmERO1a のシステイン残基と活性との関係を検討した．
**【方法】**大腸菌チオレドキシン，PDI ファミリーGmPDIL7 ，及び野生型及び活性中心あるいは制御システインと推定されたシステイン残基をアラニンに置換した変異 GmERO1a を大腸菌発現系により大量発現し，純化した．GmERO1a の GmPDIL7 酸化活性は，酸素消費速度あるいはグルタチオンレダクターゼをカップリングさせた NADPH 消費速度により測定した．GmPDIL-7 の活性中心の酸化還元状態および GmERO1a の活性化はシステイン修飾剤を用いた非還元 SDS-PAGE により検出した．
**【結果と考察】**GmERO1a は大腸菌チオレドキシン及び GmPDIL7 の活性中心を酸化する過程で自身が非還元 SDS-PAGE 上での移動度が遅い ox1 型となることから，分子内ジスルフィド結合の掛け替えあるいは還元による活性制御機構の存在が予想された．そこで，哺乳動物 Ero1 との配列比較により活性中心あるいは制御システインと推定されたシステイン残基をアラニンに置換した変異体を作製し検討した．N 末端から 10 及び 12 番目のシステインをアラニンに置換すると非還元 SDS-PAGE における移動度が野生型 GmERO1a（ox2 型）と比較して遅い ox1 となり，これらのシステイン残基が分子内ジスルフィド結合を形成していることが示唆された. 8 番目のシステイン変異では GmPDIL7 酸化活性が失われた．一方，10 及び 12 番目のシステイン変異では酸化活性が約 1.4 倍に，さらに，これらを 2 つとも変異させると約 1.9 倍となった．したがって，10 及び 12 番目のシステインが分子内ジスルフィド結合を形成することで活性を負に制御しており，GmPDIL7 によってこのジスルフィド結合が還元あるいは掛け替えられることで活性型（ox1 型）となることが明らかとなった．さらに，8 番目のシステインを変異させた GmERO1a と GmPDIL7 との反応から，GmERO1a の ox1 型への転換はジスルフィド結合の交換反応ではなく還元により行われていることを見いだした．

Ero1, Protein Disulfide Isomerase, disulfide bond

講演番号：2J30a02
講演日時：3 月 18 日 09:35～ J 校舎 30 会場

GmERO1a の基質特異性および活性型へのスイッチングとダイズ PDI ファミリーとの関係
Substrate specificity and switching of soybean ERO1a to an active form by GmPDI family proteins

○河野 慧一、松崎 元紀、廣瀬 明歩、土 雄一朗、成尾 由理香、奥田 綾、増田 太郎、裏出 令子（京大院農・農学）
○Keiichi KONO, Motonori MATSUSAKI, Akiho HIROSE, Yuichiro TSUCHI, Yurika NARUO, Aya OKUDA, Taro MASUDA, Reiko URADE (Kyoto Univ.)

**【目的】**種子貯蔵タンパク質のような小胞体で生合成されるタンパク質の大部分は，Protein Disulfide Isomerase Family Proteins (PDI)によって触媒されるジスルフィド結合を伴って立体構造が形成される．基質を酸化し活性中心が還元型となった PDI は再酸化されることで活性型に戻る必要がある．我々はダイズ ERO1 (GmERO1a)が，７グループ存在するダイズ PDI のうちグループⅠ(GmPDIL-1)，グループⅣ (GmPDIS-1， GmPDIS-2)，グループⅤ (GmPDIM)，及びグループⅦ (GmPDIL-7)の活性中心を酸化することを明らかにしてきた．また，GmERO1a も分子内のジスルフィド結合の掛け替えにより不活性型 ox2 から活性型 ox1 へのスイッチング制御を受けていることを明らかにしてきた．本研究では，GmERO1a による各 PDI の活性化と GmERO1a の活性型への PDI によるスイッチングとの関係を明らかにすることを目的に，PDI の活性中心変異体を用いて検討した．

**【方法】**GmPDIL-1，GmPDIS-1，GmPDIS-2 の活性中心システイン，および GmERO1a の活性調節システインをアラニンに置換したリコンビナントタンパク質発現用のプラスミドを作製した．野生型および変異タンパク質を大腸菌を用いて大量発現し純化した．GmERO1a の PDI 酸化活性は，酸素電極法あるいは glutathione reductase カップリング法により測定した. PDI による GmERO1a のスイッチングは，非還元 SDS-PAGE による ox2 と ox1 への移動度の違いで解析した．

**【結果と考察】**野生型の GmERO1a は, GmPDIL-1 の 2 つの活性中心の両方, GmPDIS-1 と GmPDIS-2 の **a** ドメインの活性中心のみ, GmPDIM の **a'** ドメインの活性中心のみを酸化することが明らかとなった．制御システインの変異により常に活性型である Hyperactive GmERO1a も同様の基質特異性を示したが，野生型に比して GmPDIL-1 を 1.4 倍，GmPDIS-1，GmPDIS-2，GmPDIM，GmPDIL7 を約 2 倍の速度で酸化した．これらのことから，PDI による GmERO1a のスイッチング活性に差があることが予測された. そこで, 各 PDI およびそれらの変異 PDI による GmERO1a の ox2 から ox1 へのスイッチング活性を検討し, GmPDIL-1 のスイッチング活性が, GmPDIS-1, GmPDIS-2, GmPDIM, GmPDIL7 に比して高いこと, GmERO1a によって酸化されない GmPDIL-2 にもスイッチング活性があることを見いだした．さらに，GmPDIL-1 と GmPDIM は **a** および **a'** ドメインの両方の活性中心が独立してスイッチング活性を持つが，活性中心間でスイッチング活性に差があることを明らかにした．これらの結果から，GmERO1a による PDI の活性中心の酸化反応と，PDI による GmEro1a のスイッチング反応が独立した反応であることが示唆された．

Oxidative folding, Protein Disulfide Isomerase, Ero1

講演番号：2J30a03
講演日時：3 月 18 日 09:50～ J 校舎 30 会場

# 複合体を形成する複数のダイズ PDI ファミリーによる協調的なタンパク質フォールディング
# Cooperative oxidative folding by soybean protein disulfide isomerase family proteins, which form complexes with each other

○奥田 綾、松崎 元紀、河野 慧一、土 雄一朗、廣瀬 明歩、増田 太郎、裏出 令子 (京大院農・農学)
○Aya OKUDA, Motonori MATSUSAKI, Keiichi KONO, Yuichiro TSUCHI, Akiho HIROSE, Taro MASUDA, Reiko URADE (Kyoto Univ.)

**【目的】**小胞体では，新生タンパク質の多くがジスルフィド結合形成を伴ったフォールディング(酸化的フォールディング)を受ける．真核細胞の主要な酸化的フォールディング経路として，Ero1 / Protein Disulfide Isomerase(PDI)経路が知られている．細胞小胞体には複数の PDI ファミリーが存在し,それらが連続的に酸化反応を触媒するために活性中心を活性化（酸化）するのが Ero1 などの酸化酵素である.これまでに８種類のダイズの PDI（GmPDIL-1，GmPDIL-2，GmPDIL-3，GmPDIM,GmPDIS-1，GmPDIS-2，GmPDIL6，GmPDIL7）及びダイズ Ero1(GmERO1a)を同定し，GmERO1a が複数のダイズ PDI ファミリータンパク質を酸化すること，PDI ファミリータンパク質のうち GmERO1a によって酸化されない GmPDIL-2 は GmERO1 によって酸化される GmPDIM によって酸化され，これらが生体内で複合体を形成することで協調的に基質タンパク質の酸化的フォールディングが迅速におこなわれることを明らかにしてきた．本研究では新たな複数のダイズ PDI ファミリーと GmERO1a との協調的な基質の酸化的フォールディングの作用機構を明らかにすることを目的とした.

**【方法・結果】**各ダイズ PDI ファミリーの抗血清を用いた共免疫沈降実験により，*in vivo* で GmPDIL-1/GmPDIS-1，GmPDIL-1/GmPDIS-2，GmPDIL-2/GmPDIM，GmPDIM/GmPDIS-1，GmPDIM/GmPDIS-2，GmPDIM/GmPDIL7，GmPDIS-1/GmPDIS-2，GmPDIL7/GmPDIS-1，GmPDIL7/GmPDIS-2 の 9 種類の複合体が検出された．これら複合体を形成しているダイズ PDI ファミリーについて，NADPH とグルタチオンレダクターゼのカップリング系を用いて GmERO1a による酸化速度を測定すると，GmPDIL-1 と GmPDIS-1，GmPDIL-1 と GmPDIS-2 を共存させた場合，単独での酸化速度を足し合わせた値より 1.2 倍以上に促進されることが明らかとなった．このことからすでに明らかとなっている GmPDIM と GmPDIL-2 間の活性中心 S-S 結合の受け渡しが，GmPDIL-1 と GmPDIS-1，GmPDIL-1 と GmPDIS-2 の間にも存在し，協調的な酸化的フォールディングが行われている可能性が示唆された．一方，GmPDIM と GmPDIS-1，GmPDIM と GmPDIS-2，GmPDIM と GmPDIL7，GmPDIS-1 と GmPDIS-2，GmPDIL7 と GmPDIS-1，GmPDIL7 と GmPDIS-2 の組み合わせではこのような酸化の促進は見られなかった．したがって，これらの複合体では，構成ダイズ PDI ファミリーが独立的に作用することが示唆された．以上の結果より，複数のダイズ PDI ファミリーが複合体を形成して協調的もしくは独立的にタンパク質のフォールディングを行うような巨大なフォールディング装置の存在の可能性が考えられる.

Oxidative folding, Protein Disulfide Isomerase, Ero1

講演番号：2J30a04
講演日時：3 月 18 日 10:05～ J 校舎 30 会場

ブドウ由来ミラクリン類似タンパク質の構造解析
Structural analysis of miraculin-like protein from grape
大倉 宗一郎、堀 実佐穂、古川 那由太、○井深 章子（新潟薬大・応生科）
Soichiro Okura, Misaho Hori, Nayuta Furukawa, ○Akiko Shimizu-Ibuka (Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci.)

【背景・目的】
ミラクリン類似タンパク質(Miraculin-like protein, MLP)は、味覚修飾活性（酸味を甘味に変換する性質）をもつミラクリンとアミノ酸配列の高い単量体タンパク質である。MLP は Kunitz 型トリプシンインヒビターファミリーに分類され、ブドウ、ダイズ、ナス、モモなど幅広い植物（農作物）に存在する。少なくとも一部はトリプシン阻害活性を持つが、味覚修飾活性を有するものは見つかっていない。
ミラクリンはユニークな味覚修飾活性で注目されるタンパク質であるが、その活性メカニズムは明らかになっていない。解明が難しい 1 つの要因として、解析に適したミラクリン試料の大量発現・精製の系が確立されていないことが挙げられる。我々はミラクリンの味覚修飾活性メカニズムを明らかにすることを目指し、特にミラクリンとのアミノ酸配列の相同性が高いブドウ由来 MLP(*Vitis vinifera* MLP, vvMLP)の大量発現系構築・解析を行った。
【方法】N 末端に$(His)_8$タグを付加した vvMLP を大腸菌で大量発現し、アフィニティクロマトグラフィーにより精製した。この精製標品を用いてハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶化を行い、X 線回折データを収集した。*Murraya koenigii*（ナンヨウザンショウ）由来 MLP(PDB code: 3ZC8)の構造を用いた分子置換法により位相を決定し、1.5-Å分解能で構造を決定した。また、合成基質 Benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide (BAPA) とブタ膵臓トリプシンを用いて vvMLP の阻害活性を測定した。
【結果および考察】vvMLP を大腸菌で発現させたところ、可溶性画分に大量の組換 vvMLP が得られた。この結果は、大腸菌で発現させたミラクリンが不溶性となるのとは対照的であった。vvMLP は、分子置換でモデルとしたナンヨウザンショウ由来 MLP と同様、β-トレフォイル構造を有していた。結晶中では$(His)_8$タグが分子のパッキングに大きく関与しており、vvMLP の二量体形成は見られなかった。アミノ酸配列から予想された通り、Cys44-Cys89, Cys140-Cys151, Cys144-Cys147 の 3 つのジスルフィド結合が確認された。

miraculin-like protein, crystal structure, trypsin inhibitor

発表責任者：井深章子（ibuka@nupals.ac.jp）

講演番号：2J30a05
講演日時：3 月 18 日 10:20～ J 校舎 30 会場

植物由来ミモシナーゼの反応機構及びシスタチオニンβ-リアーゼとの分子進化的関係の解明
Elucidation of reaction mechanism of plant-derived mimosinase, and the molecular evolutionary relationships with cystathionine ß- lyase
○大貝 茂希[1]、福田 雅一[2]、渡邊 啓一[4]、屋 宏典[3] ([1]鹿児島大学、[2]琉球大農、[3]琉球大熱生研、[4]佐賀大学)
○Shigeki OGAI[1], Masakazu FUKUTA[2], Keiiti WATANABE[4], Hirosuke OKU[3] ([1]Kagoshima Univ., [2]Ryukyu Univ., [3]Ryukyu Univ COMB., [4]Saga Univ.)

シスタチオニンをホモシステイン、ピルビン酸、アンモニアに加水分解するシスタチオニン ß-リアーゼ（CBL）は、C-S リアーゼに分類され、メチオニン合成に必須の酵素であり、ほとんどの菌類、植物が有している。ミモシナーゼは、ギンネムやオジギソウが有している C-N リアーゼで、それらのもつアレロケミカルであるミモシンを 3-hydroxyl-4-(1H)-pyridone、ピルビン酸、アンモニアに代謝する。ミモシナーゼはその一次構造から CBL から遺伝子重複を経て進化したということが示唆されている。しかし、進化の際に起こったアミノ酸変異や反応機構の変化は解明されていない。本研究は、CBL からミモシナーゼへの進化の際にどのアミノ酸が進化の過程で変異し、どのように反応機構が変化したかについて解明することを目的としている。C-S リアーゼから C-N リアーゼへ進化した酵素の報告は極めて少ないが、CBL とミモシナーゼの相同性は 60%ほどと高いため、これらの機能性変化をもたらしたのは限られた数のアミノ酸変異と思われる。また植物ミモシナーゼと細菌ミモシナーゼは分子系統的解析から起源を異にする収斂進化によって得られた酵素であることが予想されるが、進化の過程では共通の反応機構変化が関わったことが考えられる、それゆえ C-S リアーゼから C-N リアーゼへの変化の際に起こった分子進化的メカニズムの解明や酵素の機能改変、人工分子作成において重要な情報が得られることが期待される。
演者らは昨年度、CBL から進化したと思われるミモシナーゼや近縁酵素において基質結合部位の 2 残基が必ず変異していることを突き止め、オジギソウミモシナーゼにおいて CBL で保存されていた残基に変異させたところそれぞれミモシナーゼ活性の低下と CBL 活性の上昇が確認できたことを報告した。本年度はさらにそれらの変異の意義と周辺の残基の影響にも調査を広げて研究を行った。

evolution, Mimosinase, cystathionine beta-lyase

講演番号：2J30a06
講演日時：3 月 18 日 10:45～ J 校舎 30 会場

# 日本型イネ由来の新規除草剤抵抗性遺伝子 *HIS1* の機能解析

# Characterization of a novel herbicide resistance gene, *HIS1*, derived from japonica rice

○戸澤 譲[1]、泉 厚志[2]、武井 里美[1]、山崎 明彦[3]、関野 景介[3]、山田 祐司[3]、村田 和優[4]、前田 英郎[5]、廣瀬 咲子[6]、川岸 万紀子[6]、谷口 洋二郎[6]、川田 元滋[6]、吉田 均[6]、大島 正弘[6]、加藤 浩[7] ([1]埼玉大院理工、[2]富山県大、[3]株）エス・ディー・エス　バイオテック、[4]富山県・農林水産総合技術センター、[5]農研機構・中央研、[6]農研機構・生物機能部門、[7]農研機構・作物開発センター)

○Yuzuru TOZAWA[1], Atsushi IZUMI[2], Satomi TAKEI[1], Akihiko YAMAZAKI[3], Keisuke SEKINO[3], Yuji YAMADA[3], Kazumasa MURATA[4], Hideo MAEDA[5], Sakiko HIROSE[6], Makiko KAWAGISHI-KOBAYASHI[6], Yojiro TANIGUCHI[6], Motoshige KAWATA[6], Hitoshi YOSHIDA[6], Masahiro OHSHIMA[6], Hiroshi KATO[7] ([1]Saitama Univ., [2]Toyama Pref. Univ., [3]SDS Biotech K.K., [4]Toyama Pref. AFFRC, [5]NARO CARC, [6]NARO NIAS, [7]NARO NICS)

【目的】　*HIS1* は 4-HPPD 阻害型除草剤への抵抗性原因遺伝子として日本型イネに見出され、既知の除草剤抵抗性遺伝子との類似性がないイネ科植物に固有のタンパク質をコードしている。本研究では *HIS1* の機能を明らかにするため、遺伝子組換え植物を作出し、水稲用除草剤ベンゾビシクロン（BBC）を含むトリケトン系 4-HPPD 阻害型除草剤に対する *HIS1* の作用を解析するとともに、試験管内翻訳系を利用して HIS1 タンパク質の機能解明を進めた。

【材料及び方法】　*HIS1* を BBC 感受性のイネおよびシロイヌナズナに導入した組換え体を作出し、BBC ならびに BBC と同一作用機作で化学構造の異なる 4-HPPD 阻害型除草剤に対する感受性検定を実施した。並行して、HIS1 タンパク質をコムギ胚芽試験管内翻訳系により調製し、BBC の活性本体である加水分解体（BBC-OH）を基質とした代謝解析を行い、HIS1 の基本的な酵素機能を明らかにした。

【結果及び考察】　*HIS1* 発現個体は、イネおよびシロイヌナズナともに感受性原品種が完全白化する BBC 濃度でも抵抗性を示し正常に生育した。BBC と化学構造の異なる 4-HPPD 阻害型除草剤に対しても同様の抵抗性を示し、*HIS1* の抵抗性付与効果はビシクロオクタンジオン（BOD）系薬剤だけではなく、シクロヘキサンジオン（CHD）系薬剤に対しても同様に確認された。

HIS1 タンパク質のアミノ酸配列には、鉄配位および 2-オキソグルタル酸（2OG）結合部位を含む酸化還元ドメインの存在が予想されたことから、合成 HIS1 タンパク質を二価鉄イオンおよび 2OG の存在下で BBC-OH と反応させ、反応液を HPLC で解析した。合成 GFP を用いた対照区では BBC-OH の残存が観察されたのに対し、HIS1 反応液では BBC-OH ピークの消失が確認された。代わりに出現した BBC-OH 代謝物の構造解析を進めた結果、HIS1 タンパク質は BBC-OH の酸化修飾を触媒する Fe(II)/2OG オキシゲナーゼとして機能することで、その 4-HPPD 阻害活性を不活化し、イネに BBC 抵抗性を付与するものと推論した。さらに、HIS1 の対象化合物は BBC に限定されず、CHD 骨格を有する既存 4-HPPD 阻害型除草剤も同様に不活化されることを HPLC 解析により確認した。

我々は、以上の結果より、イネ品種間の交配による *HIS1* 遺伝子座の導入のみならず、遺伝子組換え法でも *HIS1* 遺伝子による感受性作物への除草剤抵抗性の付与が可能であることを示し、かつ水田・畑地を問わずに利用可能な除草剤の選択肢が複数あることを明らかにした。これは、イネ由来の *HIS1* 遺伝子が、新たな除草剤抵抗性遺伝子のツールとして、イネ以外の主要作物においても広く利用可能であることを示している。

rice, herbicide resistance gene, oxygenase

発表責任者：戸澤譲（tozawa@mail.saitama-u.ac.jp）

講演番号：2J30a07
講演日時：3 月 18 日 11:00～ J 校舎 30 会場

# イネ由来の除草剤抵抗性遺伝子がコードする HIS1 タンパク質の機能解析

# Characterization of HIS1 protein, which is encoded by a rice herbicide resistance gene

○武井 里美[1]、泉 厚志[2]、山崎 明彦[3]、関野 景介[3]、山田 祐司[3]、谷口 洋二郎[4]、川田 元滋[4]、吉田 均[4]、大島 正弘[4]、戸澤 譲[1]([1]埼玉大院理工、[2]富山県大、[3]株）エス・ディー・エス　バイオテック、[4]農研機構・生物機能部門)
○Satomi TAKEI[1], Atsushi IZUMI[2], Akihiko YAMAZAKI[3], Keisuke SEKINO[3], Yuji YAMADA[3], Yojiro TANIGUCHI[4], Motoshige KAWATA[4], Hitoshi YOSHIDA[4], Masahiro OHSHIMA[4], Yuzuru TOZAWA[1] ([1]Saitama Univ., [2]Toyama Pref. Univ., [3]SDS Biotech K.K., [4]NARO NIAS)

【目的】 安定した作物生産のために、水田や畑では除草剤の活用が重要である。特に標的酵素 4-HPPD の機能を阻害するベンゾビシクロン（BBC）などの除草剤は、近年利用シェアが急速に拡大している。その一方で、インド型と日本型イネの交配で育種された特定イネ品種が BBC 感受性を示したことを契機に、BBC 抵抗性品種と感受性品種を用いた遺伝解析が進み、日本型イネの二番染色体に座乗し、オキシゲナーゼ様のタンパク質をコードする *HIS1* 遺伝子が BBC 抵抗性原因遺伝子であると判明した。HIS1 タンパク質は大腸菌発現系では不溶化し、人為的に可溶化した HIS1 タンパク質での活性回復は不可能であった。そこでコムギ胚芽抽出液を用いた試験管内翻訳系により HIS1 タンパク質の合成を試みた結果、可溶性でかつ活性型のタンパク質の合成に成功し、HIS1 タンパク質の機能解析が可能となった。これまでの実験で、HIS1 タンパク質は BBC のみならず複数のトリケトン系除草剤を不活化する二価鉄イオン/2-オキソグルタル酸（2OG）依存型オキシゲナーゼであると予想されてきた。本研究では、HIS1 のアミノ酸置換型の変異導入タンパク質の作出とその酵素機能解析、さらには反応速度論的な解析手法の確立を行い、詳細な酵素機能の解明を目的として研究を進めた。
【材料及び方法】 HIS1 タンパク質のアミノ酸配列より、二価鉄イオンや 2OG の結合残基、ならびに基質ポケットに露出するアミノ酸残基を推定した。続いて部位特異的変異導入法によりアミノ酸置換型の HIS1 変異タンパク質を作出し、酵素機能の解析を行った。さらに、酵素の反応速度論的パラメーターを求めるために、酸素消費速度を測定できる酸素電極法や、コハク酸の定量的な測定法を応用した HIS1 酵素アッセイ系の確立を進めた。基質は BBC-OH（BBC の加水分解体で、酵素阻害上の活性本体）を用いて解析を進めた。
【結果及び考察】*HIS1* の二価鉄イオンや 2OG と結合すると推定したアミノ酸残基の置換は、BBC-OH 酸化修飾活性を消失させた。また、基質認識部位と予想した２つの残基のアミノ酸置換変異により同様に BBC-OH 修飾活性が著しく低下した。さらに、酸素電極法により、HIS1 タンパク質は BBC-OH 修飾反応において、酸素分子を消費することを確認した。酸素消費の測定、および 2OG に由来する酵素反応生成物であるコハク酸の定量の結果より、HIS1 が 2OG の BBC-OH のオキシゲナーゼとして機能していると結論付けた。さらに、コハク酸定量システムの導入により、HIS1 タンパク質の触媒機能を反応速度論的に解析できる系の確立に成功した。本発表では、以上の実験結果に基づき、HIS1 タンパク質の機能について得られた最新知見を紹介する。

rice, herbicide resistance gene, oxygenase

発表責任者：戸澤譲（tozawa@mail.saitama-u.ac.jp）

講演番号：2J30a08
講演日時：3 月 18 日 11:15～ J 校舎 30 会場

Screening of extracts prepared from Okinawan natural resources for neuraminidase inhibitory activity

○Hiroshi TANAKA[1], Chinen Koki[1], Uehara Chisaki[1], Minei Mieko[2], Minei Masahide[2] ([1]NIT, Okinawa College, [2]Ai leaf)

There are several kinds of natural resources grown locally in Okinawa islands. Some of the resources have been reported to have certain biological activity, such as antioxidative activity, anticancer activity and immunomodulation activity. Okinawan area additionally has some oral traditions that specific plants may have antivirus activity, especially against influenza virus. To apply those resources with antivirus activity in food ingredients for preventing flu, we have screened more than 100 extracts, prepared from local natural resources, for inhibitory effect of influenza A H1N1 neuraminidase.

Okinawan natural resources were purchased from local markets. For preparation of water extracts, 0.1 g of the dried powder of a natural resource was mixed with 2 mL of water and incubated at 80 ℃ for 30 min, then centrifuged at 15,000 rpm for 5 min to obtain supernatant as water extract. For ethanol extracts, 0.15 g of a dried powder was mixed with 3 mL of ethanol and incubated at 10 ℃ for 24 hours, then centrifuged to collect ethanol extract. Neuraminidase inhibitory activity was measured by using influenza A H1N1 neuraminidase and 4-methlyumbeliferyl N-acethylneuraminic acid as substrate. For preparation of a reaction mixture, 30 μL of 20 mM acetate buffer (pH 6.0), 20 μL of 0.5 U/mL neuraminidase and 25 μL of each extract were mixed and incubated at 37 ℃ for 2 min, followed by an addition of 25 μL of 0.1 mM substrate solution to start reaction. Fluorescent intensity (Ex: 365 nm, Em: 450 nm) was measured for 30 min with 2 min intervals and inhibitory activity was calculated based on velocities of enzymatic reaction.

We have prepared more than 50 water extracts as well as 50 ethanol extracts. Typical natural resources were as followed: sakuna (*Peucedanum japonicum*), noni (*Morinda citrifolia*), shimayama-hihatsu (*Antidesma pentandrum*), pitaya (*Hylocereus undatus*), Canistel (*Pouteria campechiana*), and Assam indigo (*Persicaria tinctoria*). Some extracts showed stimulatory effect on the neuraminidase activity while some showed indeed inhibitory activity. Results from kinetic analysis and mode of action of possible inhibitor(s) as well as possible stimulator(s) will be discussed.

neuraminidase, influenza, inhibitor

発表責任者：田中　博（h.tanaka@okinawa-ct.ac.jp）

講演番号：2J30a09
講演日時：3 月 18 日 11:30～ J 校舎 30 会場

# 細胞質分裂期における C24 エチルステロールが担う生理機能解明

# Studies on essential roles of C24-ethylsterol in cytokinesis

○山六 祐果[1]、中本 雅俊[1,2]、金谷 重彦[2]、太田 大策[1] ([1]大府大生命、[2]奈良先端情報)
○Yuka Yamaroku[1], Masatoshi Nakamoto[1,2], Shigehiko Kanaya[2], Daisaku Ohta[1] ([1]Osaka Pref. Univ., [2]NAIST)

植物ステロールは,側鎖 C24 位のアルキル化レベルの異なる C24 メチルステロール(カンペステロール）と C24 エチルステロール（シトステロール，スチグマステロール）に大別される．植物ステロールは S-アデノシルメチオニン依存の Sterol Methyltransferase（SMT）が触媒する二段階の C24 位へのメチル基転移反応により合成される．一段階目の反応は酵母などの真核微生物から高等植物まで広く保存された SMT1 が触媒し，C24 メチルステロールが合成される．二段階目の反応は多細胞植物特異的に多様化した SMT2 が触媒し，C24 エチルステロールが合成される．これらの植物ステロールの蓄積プロファイル(C24 メチルステロールと C24 エチルステロールの比)がステロール組成に反映される．植物ステロール生合成変異体を用いた先行研究結果から植物の発生・発達には正常なステロール組成が重要であるとされてきた．しかしながら「正常なステロール組成」についての明確な定義は無く，個々のステロール分子が特異的な生理機能を担う可能性についてはほとんど言及されていない．本研究は SMT2 変異によって C24 エチルステロール生合成能だけを失ったシロイヌナズナ二重変異体 *smt2 smt3* を作出・供試し，C24 エチルステロールの生理機能解明を目的とした．*smt2 smt3* は C24 エチルステロールを欠損するが C24 エチルステロールの産生能は維持している．

*smt2 smt3* は顕著な生育阻害とともにオーキシン応答反応や細胞分裂など，広範囲な異常表現型を呈した．また *smt2 smt3* 培養根で攪乱・阻害されているオーキシン分布と二次根発達が外生 C24 エチルステロールの添加によって特異的に回復したことから，C24 エチルステロールが特異的な生理機能を担うことが明らかとなった．また，細胞分裂方向の異常とオーキシン輸送体の局在異常，オーキシン極大形成の異常が胚発生初期段階から認められることから，C24 エチルステロール生合成の時空間的な制御が正常な細胞分裂（特に細胞質分裂）に関与することが推察された．そこで，C24 エチルステロール合成の知見を得ることを目的として，*SMT2* プロモーターの制御下で SMT2 と蛍光タンパク質 GFP の融合タンパク質 SMT2-GFP を *smt2 smt3* 変異系統で発現させた.SMT2-GFP の導入により,*smt2 smt3* の異常表現型は完全に回復した．SMT2-GFP は小胞体と想定される細胞内膜系に局在するが,細胞質分裂期の細胞では細胞板に SMT2-GFP が集積した．また，SMT2-GFP は細胞質分裂に特異的な syntaxin である KNOLLE を含む小胞と共に細胞板に輸送されることが明らかとなった．これらの結果から細胞板における C24 エチルステロールの合成が細胞板形成の進行に重要であることが示唆された．

sterol, cell division, cytokinesis

講演番号：2J30p01
講演日時：3 月 18 日 14:00～ J 校舎 30 会場

超好熱菌由来 Thermococcus kodakarensis 由来 subtilisin 様プロテアーゼとその利用
Application of Hyper-Thermophilic Subtilisin-like Proteases from *Thermococcus kodakarensis*.
○古賀 雄一、清水 七海、足立 航平 (阪大工)
○Yuichi Koga, Nami Shimizu, Kohei Adachi (Osaka Univ.)

超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* KOD1 のゲノム配列上には 3 種類の subtilisin-like ser protease がアノテーションされている。これらは大腸菌組換え体として発現したところ、内２種類（Tk-subtilisin、Tk-SP）は活性のあるプロテアーゼであることが確認できた。これらの酵素は、反応至適温度 90℃、100℃での半減時間 30 分と、類縁の subtilisin と比べて極めて高い熱安定性を有していることが分かっている。また、これらの酵素は界面活性剤や化学変性剤に対しても高い耐性を有していることから、様々な応用が考えられる。

例えば、異常プリオン蛋白質（PrP）はクロイツフェルトヤコブ病（CJD）などのプリオン病の感染因子とも言われ、通常の洗浄や滅菌処理に強い耐性があり、二次感染のリスクが問題となっている。また、プロテアーゼ耐性があることも知られていることから分解除去困難なターゲットとして知られているが、これまでに、Tk-subtilisin と Tk-SP は、高温、界面活性剤存在下で異常プリオン蛋白質を分解できることを確認している。本発表では医療用洗浄剤の有効成分として本酵素を使用した場合の有効性について発表を行う。

Protease, prion, thermophile

発表責任者：古賀雄一（kogay@mls.eng.osaka-u.ac.jp）

講演番号：2J30p02
講演日時：3 月 18 日 14:15～ J 校舎 30 会場

ケラチン分解酵素の機能未知βサンドイッチドメインの機能解析
Functional analysis of unknown β-sandwich domains from keratin degrading protease.
○杉田 愼之助、大政 健史、古賀 雄一（阪大工）
○Shinnosuke SUGITA, Takeshi OMASA, Yuichi KOGA (Osaka Univ.)

ケラチンは髪や爪、皮膚などを形成しているペプチドの一種であり、ケラチンが互いに結合してフィラメントを形成することで非常に強固な構造をしていることが知られている。その為、ケラチンにより形成されたタンパク質は難溶性・難分解性であり、一般的にプロテアーゼを利用した酵素処理で分解することは困難である。その為、ケラチンが産業廃棄物として排出される際に生物学的な処理が行われることは稀であり、大抵の場合は焼却処理や強塩基処理により分解を行っている。この方法は環境面に負荷がかかることが問題視されている。

一方で、一部のプロテアーゼは堅牢なケラチンタンパク質を分解する能力を有していることが報告されている。例えば、好熱性細菌 *Fervidobacterium islandicum* 由来のサチライシン様プロテアーゼである Islandisin もその一つである。この酵素は 4 つのドメインから構成されているが、その C 末端側の 2 つのβサンドイッチ構造のドメイン(SD1・SD2)の機能は未だ解明されていない。しかしながら、いくつかの細菌由来のプロテアーゼにおいて C 末端側βサンドイッチ構造ドメインは基質結合と関与していると報告されていることや、βサンドイッチ構造はフィブロネクチンや抗体の Fab 領域など結合に関係するタンパク質にも見られる構造であること、SD1・SD2 はケラチン分解プロテアーゼである Fervidolysin にも保存されているドメインであることから、私は SD1・SD2 がケラチンと結合することによりケラチンの分解を補助するドメインではないかと考えた。

そこで本研究では、SD1・SD2 の機能を解明することを目的とし、SD1・SD2 の組換え発現系を構築し、ケラチンに対する吸着性の有無を調べた。また、ケラチン分解能を有していないサチライシン様プロテアーゼである pro-Tk-subtilisin の C 末端側に SD1・SD2 を付与したキメラ酵素をモデリングし発現系を構築することで、既存のプロテアーゼに SD1・SD2 を付加することによる人工的なケラチン分解酵素の設計の可能性について検証した。

keratinase, protease, binding domain

発表責任者：古賀雄一（kogay@mls.eng.osaka-u.ac.jp）

講演番号：2J30p03
講演日時：3 月 18 日 14:30～ J 校舎 30 会場

様々な構造のタンパク質に対する新規な可溶性発現に関わるアミノ酸残基予測法の検討
Effect of the soluble expression method on protein structures
○篠田 優[1,2]、松井 大亮[1,2]、浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大工・生工研セ、[2]JST ERATO)
○Suguru SHINODA[1,2], Daisuke MATSUI[1,2], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]ERATO, JST)

【目的】異種発現系を用いたタンパク質生産において、組換えタンパク質が封入体を形成する問題がある。浅野らは大腸菌で封入体を形成する植物由来の酵素への変異導入による可溶性発現に成功した[1]。この成果をきっかけとして様々なタンパク質に対する変異導入による可溶性発現を検討し、一次構造情報から不溶性発現に関与すると予測されるアミノ酸残基 (ホットスポット) を抽出する 2 つの方法「両親媒性の α-ヘリックス構造に着目し、親水性又は疎水性領域に存在する、領域とは逆の性質を持つアミノ酸残基を抽出する方法 [2]」と「INTMSAlign[3] で解析したアミノ酸残基の保存性並びに各アミノ酸のハイドロパシーインデックスを用いて算出した HiSol スコアを指標に、アミノ酸残基の保存性並びに疎水性度が大きく異なる残基を抽出する方法 [4]」を開発した。本研究では、当プロジェクトで開発した上記 2 つの方法が様々な構造のタンパク質に適用できるか検討した。
【結果】本研究では構造分類データベース (CATH) を基に、大腸菌で不溶性発現する動物・植物・微生物由来の様々なタンパク質を分類した。その中で 13 種類のタンパク質について上記の方法を用いてホットスポットを予測し、部位特異的に変異導入を行った。各タンパク質の変異体を大腸菌 BL21 (DE3) にて発現させたところ、L-グルタミン酸脱水素酵素 (Rossmann fold)、L-フェニルアラニン脱水素酵素 (Rossmann fold)、リパーゼ (Rossmann fold)、L-オルニチン脱炭酸酵素 (TIM Barrel)、ヒト成長ホルモン (Growth Hormone Chain A)、 L-アルギニン脱炭酸酵素 (Lyase, Ornithine Decarboxylase; Chain A, domain 1)、カタラーゼ (Ferritin)、ペルオキシダーゼ (Peroxidase domain 2) の 8 種類で可溶性発現が改善した (カッコは変異導入部位が含まれる構造)。
【結論】タンパク質の構造と可溶性発現の関係に着目すると、当プロジェクトが開発した方法を用いた変異導入法は、様々な構造を持つタンパク質に対して有効であることが分かった。今後も実例を増やし、タンパク質構造と本方法の効果との関係性について検討を続ける。
【参考文献】
1) Y. Asano, *et al*., *Protein Eng. Des. Sel*., **24**, 607-616 (2011).
2) 浅野泰久, 松井大亮, 奥 祐子, PCT/JP2016/067392 (特願 2015-117808).
3) S. Nakano, and Y. Asano, *Sci Rep*., **5**, 8193-8202 (2015).
4) 中野祥吾ら, 日本農芸化学会 2016 年度大会 (札幌) 2J007.

inclusion body, protein structure, solubilization

講演番号：2J30p04
講演日時：3 月 18 日 14:45～ J 校舎 30 会場

# N 末端融合ペプチドを用いた新規可溶性発現検出法

# A novel detection system for soluble protein expression using N-terminal fusion peptide

○元島 史尋[1,2]、浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大工・生工研セ、[2]JST, ERATO)
○Fumihiro MOTOJIMA[1,2], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]ERATO, JST)

【目的】タンパク質を安価で大量に得る手段として大腸菌による発現が用いられるが、異種由来タンパク質はフォールディングが困難で不溶性に発現することが多い。この問題を解決する方法の一つに、フォールディング能が向上した可溶性変異体の取得がある。可溶性変異体のスクリーニング作業を簡略化するため、標的タンパク質の C 末端にレポータータンパク質を融合させ、その酵素活性、GFP 蛍光、抗生物質耐性などを指標にする方法が報告されている。しかし C 末端への融合はタンパク質の不安定化や多量体形成阻害を引き起こす場合がある。N 末端にレポータータンパク質を融合させると標的タンパク質の状態に関わらずレポータータンパク質がフォールディングし擬陽性が生じるため、N 末端への融合を用いた有効な検出法は報告されていない。
【方法】バクテリアの Tat 輸送装置は native 状態のタンパク質のみをペリプラズム内に輸送し、変性状態のタンパク質を分解経路に移行させることが知られており(1)、これを利用して N 末端融合で起こる擬陽性の問題を解決できると考えた。標的タンパク質には TorA 由来 Tat シグナルペプチドと split-GFP の $GFP_{11}$ ペプチド(2)を付加し、Tat シグナルペプチドを付加した $GFP_{1\text{-}10}$ 部分を共発現させ、大腸菌ペリプラズム内で両者が結合して GFP 蛍光を呈するように設計した。
【結果】C 末端への融合により不溶性に発現するキャッサバ(*Manihot esculenta*)由来 hydroxynitrile lyase (*Me*HNL)を用いて本スクリーニング法を検証した。30˚C においてほとんど可溶性に発現しない野生型 *Me*HNL では GFP 蛍光が小さく、可溶性に発現する H103M 変異体(3)では GFP 蛍光が高いことから、可溶性発現量と蛍光強度の間に相関性が見られた。次に野生型 *Me*HNL を error-prone PCR によりランダム変異し、蛍光を呈するコロニーをスクリーニングした。スクリーニングにより得られた 6 種類のクローンのうち、3 つのクローンは可溶性に発現する H103L 変異体を含んでいた。また擬陽性の数は少なかった。したがって本方法は N 末端への融合を用いた有効な検出法であると言える。現在、他のタンパク質について本方法を適用し検証を行っている。
【References】(1) Thomas, J.D. *et al.,* (2001) *Mol. Microbiol.* **39**, 47–53. (2) Cabantous, S. *et al.,* (2005) *Nat. Biotechnol.* **23**, 102–107. (3) Asano, Y. *et al*., (2011) *Protein Eng. Des. Sel.* **24**, 607–616.

protein expression, screening, GFP

発表責任者：浅野　泰久（asano@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：2J30p05
講演日時：3 月 18 日 15:00～ J 校舎 30 会場

新規環状ペプチドの開発に向けたラジカル SAM 酵素 QhpD の基質特異性解析
Analysis of substrate specificity of radical SAM enzyme QhpD for developing novel cyclic peptides
○小酒井 一輝、中井 忠志、谷澤 克行、岡島 俊英（阪大産研）
○Kazuki KOZAKAI, Tadashi NAKAI, Katsuyuki TANIZAWA, Toshihide OKAJIMA (ISIR, Osaka Univ.)

QhpD は *S*-アデノシル-L-メチオニン（SAM）と鉄硫黄クラスターを用いて各種の難化学反応を触媒するラジカル SAM 酵素の一種であり、基質ペプチドの QhpC 内の特定の Cys 残基の硫黄原子と Glu または Asp 残基のメチレン炭素間に分子内チオエーテル架橋を 3 ヵ所形成する。3 ヵ所のチオエーテル架橋は、Cys が常に Glu/Asp の 6〜9 残基前に存在し、架橋で生じるキラル炭素原子がすべて *S* 型の立体配置をとる共通性をもつため、QhpD の活性部位の立体構造が基質特異性を決定していると推定される。私たちはこれまでに *Paracoccus denitrificans* 由来の QhpD と QhpC を用いて *in vitro* 架橋反応系を確立し、SAM と還元剤（$Na_2S_2O_4$）の存在下で QhpC 内に架橋を形成させることに成功している。QhpC は N 末端側に 28 残基のリーダー配列と C 末端側に 3 ヵ所の架橋部位もつが、リーダー配列と 1 番目の架橋部位（CTTSFDPGWE：下線は架橋形成残基）のみの短縮型（sQhpC）でも QhpD の基質となり、*in vitro* で架橋反応が進行する。sQhpC の Cys と Glu 残基が直接的に架橋反応を受けるが、両残基にはさまれた領域（架橋ループと呼ぶ）の配列や長さを変更しても架橋が形成されるのかは不明である。また、一般的にペプチドは環状化により様々な生理機能が付与されることが知られており、ペプチドの分子内架橋により環状構造を形成する QhpD の触媒機構を詳細に解明することは、新規の機能性環状ペプチドを創出するためにも重要である。今回、QhpD の基質特異性を明らかにすることを目的として、複数の QhpC 変異体を用いて QhpD による架橋形成を調べた。まず、N 末端 His タグ融合 QhpD は C 末端 Strep タグ融合 sQhpC との複合体として大腸菌で共発現させた後、嫌気的条件下で 2 種類のアフィニティカラムを用いて精製した。鉄硫黄クラスターを再構成した後、SAM と還元剤を加えて架橋反応を行い、質量分析により反応の有無を同定した。この際、Cys と Glu 残基間の架橋ループ（TTSFDPGW）の変異体を基質として活性を測定した。その結果、架橋ループを Ala 残基で 1〜3 残基伸長した変異体 TTSFNAPGW, TTSFNAAPGW, TTSFNAAAPGW では、いずれも架橋が形成されなかった。一方、架橋ループを 5 残基に短縮した変異体 TTPGW では架橋形成が見られた。また、Pro 残基の Ala 変異体 TTSFDAGW、複数残基の変異体（TTVSLPGW および RPNLLPGW）では、架橋が形成され形成速度はいずれも野生型の約 1/10 であった。以上の結果より、架橋ループが 5〜8 残基であれば、任意の配列に変更しても反応速度は低下するものの架橋を形成できることが明らかになった。QhpD が新規の機能性環状ペプチドを創出するための有用なツールとなる可能性が示唆された。

cyclic peptide, radical SAM enzyme, thioether bond

発表責任者：小酒井一輝（kozakai.kazuki44@sanken.osaka-u.ac.jp）

講演番号：2J30p06
講演日時：3 月 18 日 15:25～ J 校舎 30 会場

# チロシナーゼを用いたテアフラビン合成反応の特異性

Specificities of tyrosinase-catalyzed synthesis of theaflavins.

○奈良井 朝子、川島 彩、内田 有香、川村 美穂、中山 勉（日獣大　応生科）
○Asako NARAI, Aya KAWASHIMA, Yuuka UCHIDA, Miho KAWAMURA, Tsutomu NAKAYAMA (Nippon Veterinary and Life Science Univ.)

【背景・目的】　紅茶に含まれる赤橙色色素のテアフラビン（TF）類は、茶葉由来のポリフェノール酸化酵素によるカテキン酸化と酸化物どうしの非酵素的な 2 分子縮合を介して生成するベンゾトロポロン骨格をもつ化合物である。縮合するカテキンの組み合わせは、B 環がカテコール型の(-)-エピカテキンまたはそのガレート（EC, ECg）と B 環がピロガロール型の(-)-エピガロカテキンまたはそのガレート(EGC, EGCg)であり、4 種類の TF（TF1, TF2A, TF2B, TF3）が存在する。これまで TF 類には様々な生理活性が報告されており、更なる研究や応用に向けた TF の安定供給のため、紅茶製造中の TF 合成過程の解析や茶葉以外の酵素を用いた TF 類の合成が試みられている。しかし、カテキン類、TF 類ともに不安定であることや、TF 合成経路には酵素反応だけでなく非酵素的な反応が複雑に絡むことから、基質特異性や生成物の収率・収量について詳細に解析した例がない。そこで本研究では、ポリフェノール酸化酵素のモデル酵素として研究に用いられているマッシュルーム由来チロシナーゼを用い、カテキン類に対する基質特異性ならびに TF 合成反応の特徴を調べた。
【方法】　4 種類のカテキン（EC, ECg, EGC, EGCg）をそれぞれ単独あるいは 2 種類で組み合わせ、チロシナーゼを添加してリン酸緩衝液 pH 6.0、25℃で反応させた。経時的にサンプリングと反応停止をおこない、カテキン類と TF 類の濃度変化を RP-HPLC を用いて分析した。
【結果】　それぞれのカテキンを単独でチロシナーゼと反応させたところ、いずれのカテキンも減少した。基質濃度が 2 mM の時、触媒定数は EC が最も大きく、ECg が最も小さかった。EGC のみ、4 mM 以上でチロシナーゼによる酸化反応が阻害された。見かけの Km 値は EGCg が最小で、EC が最大であった。次に、カテキンを 2 mM ずつ 2 種類組み合わせてチロシナーゼを作用させたところ、EGC, EGCg の方が EC, ECg よりも顕著に減少し、それに伴いそれぞれの組み合わせに該当する TF 類が生成し増加した。単独反応との比較から、EC, ECg の酸化物であるキノンが非酵素的に EGC, EGCg を酸化すると同時に自身は還元されて元に戻ることが示唆された。また、この共役的なレドックス反応は EGC よりも EGCg において鋭敏に起こっており、酵素に対する親和性が影響している可能性が考えられた。EGC, EGCg がほぼ完全に消費した後は、EC, ECg の減少に伴い TF 類が減少した。TF 類はチロシナーゼによって酸化されないことから、反応系で EGC, EGCg が枯渇すると EC, ECg 由来のキノンが TF 類を酸化・消失させると推測された。なお、本実験条件において、TF 類の反応中最大収量は TF1＞TF2B≧TF2A＞TF3 であった。

theaflavin, tyrosinase, enzymatic synthesis

講演番号：2J30p07
講演日時：3 月 18 日 15:40～ J 校舎 30 会場

ヒト由来糖転移酵素の共発現によるカイコ発現エリスロポエチンの *N*型糖鎖構造改変
*N*-Glycosylation modification of human erythropoietin by co-expression of human glycosyltransferases in silkworm

○堀場 早紀[1]、加子 夏未[1]、宮崎 剛亜[1,2]、加藤 竜也[1,2]、近藤 幸子[3,4]、加藤 晃一[3,4,5]、矢木 宏和[3]、朴 龍洙[1,2]（[1]静大院・農、[2]静大グリーン科技研、[3]名市大院・薬、[4]株式会社医学生物学研究所、[5]自然科学研究機構・岡崎統合バイオ）
○ Saki HORIBA[1], Natsumi KAKO[1], Takatsugu MIYAZAKI[1,2], Tatsuya KATO[1,2], Sachiko KONDO[3,4], Koichi KATO[3,4,5], Hirokazu YAGI[3], Enoch Y. PARK[1,2] ([1]Fac. Agric., Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. of Pharm. Sci., Nagoya City Univ., [4]MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD, [5]Okazaki Inst. for Integr. Biosci., Nat. Inst. of Nat. Sci.)

【背景・目的】近年、バイオ医薬品の需要は急増しており、タンパク質発現能力が高いカイコが宿主として注目されている。しかし、カイコで発現させた糖タンパク質の *N*型糖鎖は、ほとんどが高マンノースもしくはパウチマンノース型糖鎖であり、哺乳動物細胞でみられる複合型糖鎖は殆ど認められない。そのため、カイコは医療用タンパク質生産宿主としては不向きとされている。本研究では、カイコ体内でヒト由来糖転移酵素を発現させることでカイコ *N*型糖鎖合成経路改変を試みた。糖鎖の付加は、ヒトエリスロポエチン（hEPO）を共発現させ、レクチンブロットと糖鎖構造解析でカイコ *N*型糖鎖付加経路改変を評価した。
【方法】hEPO またはヒト β-1,2-*N*-acetylglucosaminyltransferase II（hβ2GnTII）遺伝子をカイコで発現可能な *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) バクミドに挿入することでそれぞれ組換え BmNPV/hEPO と BmNPV/hβ2GnTII バクミドを構築し、カイコ幼虫で発現させた。構築した各バクミドをカイコ 5 齢幼虫に注射し、5 日間飼育後、各組換えウイルスを含むカイコ体液を回収した。組換えウイルス BmNPV/hEPO と BmNPV/hβ2GnTII を 1 : 3 の割合で混合し、カイコ幼虫に感染させ共発現させた。発現した組換え hEPO は、カイコ体液から回収し、硫安沈殿とアフィニティークロマトグラフィーで 2 段階精製を行った。*N*型糖鎖の末端 *N*-アセチルグルコサミン（GlcNAc）を認識する GSⅡを使用したレクチンブロットにより、hEPO の *N*型糖鎖構造を推定した。
【結果】カイコ体液と脂肪体内で hEPO と hβ2GnTII の発現は、ウエスタンブロットによりそれぞれ 25 と 52 kDa に確認された。また、hEPO はカイコ体液から硫安沈殿とアフィニティークロマトグラフィーにより精製ができた。レクチンブロットでは、単独発現の hEPO に比べて hβ2GnTII を共発現させた hEPO で、強くバンドが認められた。hβ2GnTII を共発現することで hEPO の糖鎖末端への GlcNAc 付加が示唆された。現在、それらの詳しい糖鎖構造解析を行っている。

silkworm, *N*-glycosylation, human erythropoietin

発表責任者：堀場早紀（horisaki.98@gmail.com）

講演番号：2J30p08
講演日時：3 月 18 日 15:55～ J 校舎 30 会場

PET 分解酵素クチナーゼの基質結合モデルと高機能化
Substrate-bound 3D structure modeling of cutinase to generate mutants with increased activities
○織田 昌幸[1]、川端 猛[2]、河合 富佐子[3]([1]京府大院生環科、[2]阪大蛋白研、[3]京工繊大繊科セ)
○Masayuki ODA[1], Takeshi KAWABATA[2], Fusako KAWAI[3] ([1]Kyoto Pref. Univ., [2]Osaka Univ., [3]Kyoto Inst. Technol.)

*Saccharomonospora viridis* AHK190 由来のクチナーゼ Cut190 は、$Ca^{2+}$存在下で polyethylene terephthalate (PET)を分解する。S226P/R228S 変異体 (Cut190*) は熱安定性も高く、PET 分解活性も高いことから、応用利用を見据えたさらなる高機能化酵素の創製に向け、同時に $Ca^{2+}$結合に伴う酵素機能発現機構の解明に向けて、非常に興味深い研究対象となる。これまでの研究で、S226P 変異体については、$Ca^{2+}$有、無での各 X 線結晶構造が解かれ、$Ca^{2+}$結合に伴い、大きな構造変化が誘起されることも明らかにされた。一方、基質との複合体構造情報は得られていない。そこで本研究では、PET モデル化合物を用い、既知の結晶構造を利用して、Cut190*との基質結合モデルを構築した。モデル構築にあたっては、基質モデル化合物の創出、プログラム ghecom を用いた Cut190 結晶構造上での基質結合ポケットの推定、さらにプログラム fkcombu を用いた複合体構造モデルの構築、の手順で行った。次にこの基質結合モデルを検証することと、より高活性な変異体を得ることを主目的として、13 カ所のアミノ酸残基を個々に、あるいは組み合わせて置換した 21 種類の変異体を調製し、その酵素活性能を実験的に決定した。その結果、F255A や H175A の変異体などで、活性が大きく低下した。F255 や H175 の部位への基質結合は、$Ca^{2+}$有での結晶構造を鋳型とした複合体モデルで良く説明できることから、本研究で得られた同モデルの確からしさが実証された。一方、Q138A や I224A の各変異体で、酵素活性が大きく上昇した。Q138 部位は、本研究モデリングにおいて、基質結合部位に位置するが、その側鎖が基質ポリマーの伸長方向を妨害する可能性が示唆された。Q138A では、その側鎖サイズを小さくしたことで、$K_m$ 値が低下し、高機能化できたと考えられる。I224 部位も、基質結合に関与することが予想され、さらに S176-H254-D222 の catalytic triad 近傍に位置する。結果として $k_{cat}$ 値が高くなったことからも、何らか触媒反応機構に影響し、高機能化されたと考えられる。

protein engineering, modeling, enzyme activity

発表責任者：織田昌幸（oda@kpu.ac.jp）

講演番号：2J30p09
講演日時：3 月 18 日 16:10～ J 校舎 30 会場

C-terminal truncation improved the enzyme stability of recombinant hydroxynitrile lyase from *Passiflora edulis* expressed in *Escherichia coli*

○Aem NUYLERT[1], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Biotechnology Research Center, Toyama Prefectural Univ., [2]Asano Active Enzyme Molecule Project, ERATO, JST)

[Purpose] A hydroxynitrile lyase from *Passiflora edulis* (*Pe*HNL) was isolated, purified [1] and its gene was successfully cloned into *E. coli* and *P. pastoris*.[2] We found that Asn105 glycosylation site located at C-terminus plays roles in improvement of enzyme stability under various pH, temperature and organic solvent conditions. When *Pe*HNL was expressed in *P. pastoris*, the wild-type showed significantly higher stability than the enzyme expressed in *E. coli* which lacks glycosylation system. These results indicated that the presence of glycan at C-terminus might contribute to the stability of *Pe*HNL. However, there is a drawback of the use of high cost complex medium and time consuming production of *Pe*HNL in *P. pastoris*. Therefore, we truncated C-terminal region including Asn105, expecting an improvement of the properties and stabilities of *Pe*HNL in *E. coli*.

[Materials and Methods] The possibility of a reduction in length of the enzyme at C-terminus without the loss of activity was investigated using site-directed mutagenesis. Those mutants were purified, characterized and their properties were compared with the wild type *Pe*HNL. The substrate specificity of the enzymes on synthesis and enantiomeric excess of the cyanohydrin products were determined in aqueous phase system and biphasic system.

[Results] *Pe*HNL has a small molecular mass consisting of 121 amino acids (*Pe*HNL121) and the C terminus 20 amino acids could be removed (*Pe*HNL101△C) while still having measurable activity toward (*R*) -mandelonitrile synthesis. *Pe*HNL truncated by 15 amino acids (*Pe*HNL106△C) showed much better thermostability, pH stability, and organic solvent tolerance in di-isopropyl ether than a wild-type *Pe*HNL121.

[1] a) Y. Asano, K. i. Tamura, N. Doi, T. Ueatrongchit, A. H-Kittikun, T. Ohmiya, *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2005**, *69*, 2349-2357; b) T. Ueatrongchit, K. i. Tamura, T. Ohmiya, A. H-Kittikun, Y. Asano, *Enzyme Microb. Technol.* **2010**, *46*, 456-465.

[2] A. Nuylert, Y. Ishida, Y. Asano, *ChemBioChem* **2016**, (in press)

Hydroxynitrile lyase, C-terminal truncation, Enzyme stability

講演番号：2J30p10
講演日時：3 月 18 日 16:25～ J 校舎 30 会場

# 指向性進化による転写因子 XylS のリガンド認識能の改変

# Modification of ligand-specificity of XylS through directed evolution

勝山 陽平[1]、○小川 友希[2]、上野 堅登[2]、大西 康夫[1] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]東大農・生命化学工学)
Yohei KATSUYAMA[1], ○Yuki OGAWA[2], Kento UENO[2], Yasuo OHNISHI[1] ([1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., Univ. of Tokyo, [2]Fac. of Agric., Univ. of Tokyo)

【背景・目的】バイオセンサーは生体内の分子認識機構を利用して対象物を検出するセンサーであり、環境中や生体内の化合物量を簡便に可視化する有用なツールである。しかし、目的の化合物を認識するバイオセンサーが必ずしも天然に存在するとは限らないため、リガンド認識能を改変し目的の化合物を認識するバイオセンサーを開発する必要がある。その手法の一つに指向性進化があり、この手法では酵素やリガンド結合タンパク質が変異と自然淘汰を経て最適化されてきたという過程を人工的に模倣することでタンパク質の機能の改変を行う。本研究では指向性進化を利用してバイオセンサーのリガンド認識能を効率的に改変する方法を確立することを目指した。
【結果・考察】本研究では *Pseudomonas putida* 由来の XylS を研究対象として用いた。XylS は芳香族化合物を認識するバイオセンサーとして利用可能な転写因子であり、リガンドと複合体を形成すると $P_m$ プロモーターに結合し下流遺伝子の転写を活性化する。まずモデルケースとして、本来 *m*-toluic acid (*m*-TA) を認識する XylS を、*p*-toluic acid (*p*-TA) を認識できるように改変することを目指した。$P_m$ プロモーターの下流に ampicillin (Amp) 耐性遺伝子と TetR 遺伝子の人工オペロンを配置するとともに、TetR 標的プロモーターの下流に chloramphenicol (Cm) 耐性遺伝子を保持するプラスミド (pUKN009) を構築した。一方、*lac* プロモーターの下流に XylS 遺伝子を配置したプラスミド (pCDFlac-XylS) を構築し、pUKN009 とともに大腸菌に導入した。この組換え大腸菌はリガンド存在下で Amp 耐性かつ Cm 感受性、リガンド非存在下で Amp 感受性かつ Cm 耐性となる表現型を示した。ただし TetR による抑制が強力なため、培地に適切な量の tetracyclin を添加し抑制能を弱める必要があった (tetracyclin は TetR に結合し、その DNA 結合能を消失させる)。次に error prone PCR によりランダム変異を導入した XylS 遺伝子を持つ pCDFlac-XylS の変異ライブラリーを作製し、pUKN009 とともに大腸菌に導入した。生えてきた全てのコロニーを合わせて回収し、Cm 存在下で液体培養し偽陽性を排除した後に、Amp と *p*-TA 存在下で液体培養し *p*-TA をより強く認識する変異 XylS を有する大腸菌を濃縮した。この培養から回収した変異 XylS 遺伝子を鋳型として再び変異を導入しライブラリーを作製した。この変異導入、培養による偽陽性排除とリガンド認識能改変 XylS の選抜を一連の流れとするサイクルを 4 回繰り返し、アミノ酸変異が 2 ヶ所入ったリガンド認識能改変 XylS を得た。この XylS のリガンド認識能を評価するために Pm プロモーターの下流に mCherry 遺伝子を配置したプラスミドを構築し大腸菌に導入した。種々の濃度のリガンド存在下で培養した大腸菌細胞の蛍光強度を比較することにより、リガンド認識能改変 XylS は野生型 XylS が *m*-TA を認識するのと同程度の感度で *p*-TA を認識できるようになっていることが確認できた。今後この系を応用し異なるリガンド認識能を持つ様々な変異 XylS を構築する予定である。

directed evolution

講演番号：2J30p11
講演日時：3 月 18 日 16:50～ J 校舎 30 会場

タンパク質進化経路における安定性の役割
The role of protein stability in evolutional pathway
○倉橋 亮、佐野 智、高野 和文（京府大院）
○Ryo KURAHASHI, Satoshi SANO, Kazufumi TAKANO (Kyoto Pref. Univ.)

【目的】
進化は生命にとって最も特徴的な性質の一つである。それゆえ、進化に関する研究は生命現象を理解する上で大変重要である。タンパク質は、たった一つの変異でさえ機能に影響を及ぼすという点で、進化研究のモデルとして適している。タンパク質に対して新規の機能やより向上した機能を付与する変異はそのほとんどがタンパク質を不安定化させる。しかし、近年、好熱菌タンパク質は高い熱安定性を持つために、そのような有害な変異に耐えることができるとの研究結果が報告されてきた。このように、高い安定性は進化にとって重要な因子であるが、タンパク質進化過程における安定性の役割はいまだに明らかになっていない。そこで本研究では、好熱性 Archaea タンパク質である *Sulfolobus tokodaii* 由来エステラーゼ（Sto-Est）を用いた進化実験を行う。タンパク質の安定性に着目し、安定性を保持した変異体と損失した変異体を進化させながら、活性変動を観測することにより、進化と安定性の関係を直接的に検証した。これにより、タンパク質進化における安定性の役割の解明を試みた。
【結果・考察】
本実験では、Sto-Est 遺伝子に対して、Error-prone PCR によるランダム変異を導入し、大腸菌にて大量発現させた。進化に関しては、変異による活性の向上と定義し、75℃での活性測定により評価した。安定性に関しては、90℃での熱処理後の残存活性を測定した。そして、特徴的な変異体を次の世代のテンプレートとして用いた。第一世代において、約 20%のランダム変異体が野生型（WT）よりも高い活性を示した。その中で、安定性を保持したタンパク質と損失したタンパク質を選抜し、高活性側と低活性側で比較実験を行った。高活性変異体側では、安定性保持変異体は損失変異体に比べて活性増加率が高いことが示された。低活性側では、安定性保持変異体は第三世代において、WT と同等の活性まで回復したのに対し、安定性損失変異体は第二世代において、全てのランダム変異体が活性を大きく低下させた。このことから、活性回復には、安定性が必須因子であることが実験的に検証できた。さらに、安定性を構造的に評価するために、Circular Dichroism を用いて各テンプレートの Tm 値を測定した。その結果、親タンパク質とその次の世代の最高活性との間におおよその相関がみられた。以上より、安定性は進化を駆動する役割を担っていることが実験的に証明することができた。この知見はタンパク質工学への応用が期待される。また、低活性変異体における安定性を考慮した進化は、タンパク質進化において新たな経路を提案するものである。

evolution, stability, esterase

発表責任者：倉橋亮（s814631015@kpu.ac.jp）

講演番号：2J30p12
講演日時：3 月 18 日 17:05～ J 校舎 30 会場

# 円石藻 *Pleurochrysis carterae* に対する Ca、P の石灰化への影響

# Effects of Ca and P on calcification of the coccolithophorid *Pleurochrysis carterae*

○新井 真子[1]、関 和輝[1]、長坂 征治[1,2,3] ([1]東洋大 生命科学、[2]東洋大院 生命科学、[3]東洋大学生命環境科学研究センター)
○Mako ARAI[1], Kazuki SEKI[1], Seiji NAGASAKA[1,2,3] ([1]Life Science , Toyo University, [2]Graduate School of Life Sciences, Toyo University, [3]Research Center for Life and Environmental Sciences)

円石藻は世界中の海に生息する真核細胞藻類で、石灰化を行うことで細胞の周りにココリスと呼ばれる炭酸カルシウムを主成分とした殻を形成する。ココリスの形成は非常に精巧に制御されており、種ごとに異なる数 μm の微細な形態をもっている。その制御機構は未知であるが、これを解明することが出来れば材料分野などへの応用が期待できる。ココリスには酸性多糖が多量に含まれていることが報告されており、他の生物のバイオミネラルにおける酸性分子と同様、ココリス形成にも酸性多糖類が関与している可能性が示唆されている。本研究では、ココリスの形状が比較的簡単で培養系の確立している円石藻 *Pleurochrysis carterae* を使用し、栄養塩濃度の変化に伴う多糖量の推移とココリス形態の変化を解析した。

*P. carterae* を異なるリン酸濃度あるいはカルシウム濃度条件下で 1 週間培養し、24 時間ごとに濁度、クロロフィル a 量から生育を測定した。培養後に細胞を回収、分解し、ICP-MS によって細胞内および細胞外の金属を測定しココリス形成の指標とした。また、培養後の細胞を EDTA によって脱灰し限外ろ過で濃縮、洗浄した後、ココリス中の酸性多糖量、中性多糖量を測定した。このサンプルを SDS-PAGE 電気泳動に供し、Stains All で酸性多糖を染色した。また、培養液中の栄養塩の変化によるココリスの形態への影響を走査型電子顕微鏡（SEM）で観察した。

リン酸濃度の異なる培地で培養した場合、リン酸濃度の低下に伴い、濁度とクロロフィル量が減少していたが、酸性多糖、中性多糖量の含有量には増加が認められた。また、酸性多糖よりも中性多糖の方が多い傾向が認められた。一方、SEM 観察では低濃度のリン酸条件で培養した円石藻のココリスは未熟なものが多く観察された。カルシウム濃度の異なる培地での培養では、カルシウム濃度の上昇と共に濁度の上昇が認められたが、クロロフィル a 量に変化は見られなかった。多糖量の分析からは、カルシウム濃度の上昇に伴って多糖量が増加していることが明らかになり、酸性多糖の方が中性多糖より多くなっていた。SEM 観察では、カルシウム濃度の上昇にともなうココリスを形成する炭酸カルシウム結晶の成長が観察された。

以上の結果から、異なる培地条件で培養した円石藻の比較から、酸性多糖が同等に含まれていてもココリスの形態に大きな違いが生じる事が明らかとなった。このことは、ココリスの形成には酸性多糖の量ではなく、その組成が重要である可能性を示唆しているため、現在、細胞から抽出した多糖の組成や比率について解析を進めている。

biomineralization, Pleurochrysis carterae, coccolith

講演番号：2J30p13
講演日時：3 月 18 日 17:20～ J 校舎 30 会場

# Identification of the proteins involved in tooth mineralization in the giant pacific chiton, *Cryptochiton stelleri* by transcriptome and proteome analysis

○Michiko NEMOTO[1], Dongni REN[2], Steven HERRERA[2], Takashi TAMURA[1], Kenji INAGAKI[1], David KISAILUS[2] ([1]Okayama Univ., [2]University of California, Riverside)

[Introduction]

*Cryptochiton stelleri* is the world's largest species of chiton whose mineralized radular teeth are consist of an iron phosphate and magnetite ($Fe_3O_4$). Mechanical characterization of the tooth of *C. stelleri* showed that it has the maximum hardness and stiffness of any known biomineral. To elucidate the molecular mechanisms regulating the tooth mineralization of *C. stelleri*, whose genome has not been sequenced, we previously conducted proteomic analysis of fully mineralized radular teeth using de novo peptide sequencing (***Proteomics*** 2012, **12**, 1–5). In the present study, to determine more peptide sequences, transcriptome database for *C. stelleri* radular tissue was constructed and further used for protein identification.

[Method]

Total RNA was extracted from freshly dissected radular tissue which include radular membrane, base, mineralized teeth and epithelial cells surrounding radular tissue. The cDNA library prepared from total RNA was sequenced by illumina Hiseq. The resulting reads were de novo assembled by Trinity program to build transcriptome database. The transcriptome database was further used for protein identification from MS/MS spectra obtained from mineralized radular teeth proteins.

[Results]

Transcriptome sequencing generated 89,467,126 raw reads. A total of 187,980 unique transcripts with an average sequence length of 705 bp were obtained from de novo assembly of the reads. As a result, 95 proteins were identified from radular teeth. Among them, 59 proteins were identified as mineralized teeth-specific proteins. Those proteins include proteins related to metal transport and metabolisms, a number of peroxidases and proteins shared similarity with the previously reported biomineralization-related proteins. In conclusion, by combining transcriptome sequencing and proteome analysis, several proteins that may be responsible for tooth mineralization in *C. stelleri* were newly identified in this study.

proteomics, biomineralization, chiton

講演番号：2J30p14
講演日時：3 月 18 日 17:35～ J 校舎 30 会場

# エレクトロスピニングを用いた抗がん剤を含有する新規徐放性担体の機能の検討

# Evaluation of a sustained release carrier containing an anticancer drug which is generated by electrospinning

八部 雄太[1]、多田 一風太[1]、牧田 昌士[2]、坪田 庄真[3]、岸田 聡[3]、西川 靖俊[2]、門松 健治[3]、○池松 真也[1] ([1]沖縄高専、[2]オルソリバース、[3]名古屋大学)
Yuta YABE[1], Ipputa TADA[1], Masashi MAKITA[2], Syouma TSUBOTA[3], Satoshi KISHIDA[3], Yasutoshi NISHIKAWA[2], Kenji KADOMATSU[3], ○Shinya IKEMATSU[1] ([1]National Institute of Technology. Okinawa College, [2]ORTHOREBIRTH, [3]Nagoya Univ.)

日本、世界での死亡率上位には悪性新生物としてがんがあり、がんの治療には抗がん剤治療が多く用いられている。現在、抗がん剤治療を外来で受けることができるようになり、多くの患者が外来で治療を受けているが、その副作用によって緊急入院する患者も多いのが現実である。抗がん剤による副作用を抑え、患者の生活の質を向上させることは、多くのがん患者が抗がん剤治療続けていく上で必須である。抗がん剤の副作用を抑える方法の一つに、抗がん剤の局所投与によって全身への循環を防ぎ、全身性の副作用を生じさせないことが挙げられる。現在、抗がん剤の局所投与を可能とする技術として、ドラックデリバリーシステムが注目されており、その材料開発・活用については多くの研究が行われている。
本研究ではエレクトロスピニング法(ES 法)で作製した新規ドラッグデリバリー(DDS)担体の有効性を抗がん剤であるカルボプラチンとがん化マウスを用いて検討した。
本研究には交感神経特異的な酵素である Tyrosine Hydroxylase (TH) のプロモーターから MYCN 遺伝子を発現させるトランスジェニックマウス (Weiss et al) を 129tTer/SyJcl wild-type mice(CLEA Japan)でバッククロスして系統化したホモ接合型 マウスを用いた (Kishida et al)。マーカーの１つである TH を発現するタイミングで MYCN を発現させるこのマウスでは、交感神経説の一つである上腸間膜神経節から神経芽腫を発症し約 8 週齢で死亡する。
ES 法で作成されたカルボプラチン含有ポリ乳酸-グリコール酸共重合体（綿状担体）３０倍体量を 4 週齢ホモ接合型マウスの腹腔（主な神経芽腫発生部位である腹部上腸間膜神経節付近）に、麻酔下手術にて留置した場合と、綿状担体が含有するカルボプラチン量と同量を、直接腹腔内に投与した場合、比較対象としてリン酸緩衝生理食塩水を腹腔内に投与した場合の実験を行った結果、カルボプラチンを直接投与したマウスは、重大な副作用によって寿命を待たず数日で死亡したが、綿状担体を埋植したマウスは、副作用も見られず、寿命である約 8 週齢を超えて 12 週齢で剖検のため安楽死となったが、病理検査の結果がん細胞は観察されなかった。
また、ES 法で作成されたカルボプラチンを含まない綿状担体を 4 週齢のホモ接合型マウスの腹腔に留置し、その影響についての検討も行った。
抗がん剤を含んだ綿状担体の腹腔内への留置によって、全身性の副作用を生じさせない抗がん剤の局所投与が可能となり、なおかつ抗がん剤の作用を損なわずがん細胞を死滅させる示唆が得られた。

Electrospinning, Drug delivery

講演番号：2J30p15
講演日時：3 月 18 日 17:50～ J 校舎 30 会場

遺伝子改変ヘパトーマ細胞の肝機能誘導における薬剤添加の影響
Effect of small molecule addition on hepatic function induction of genetically modified hepatoma cells
○上平 正道、佐藤 一輝、トネロ ジェーン、河邉 佳典、井藤 彰（九大工）
○Masamichi KAMIHIRA, Kazuki SATO, Jane Tonello, Yoshinori KAWABE, Akira ITO (Kyushu Univ.)

バイオ人工肝臓システムは、肝機能に重篤な傷害を有する患者の肝機能を補うための有力な方法として期待されているが、肝機能を発揮する細胞をバイオリアクターに充填して用いるため、その性能は充填する細胞の肝機能発現に大きく依存する。これまで、生体肝から採取した初代肝細胞が多く検討されてきたが、肝機能発現が高い半面、体外における増殖・培養が困難であるという問題点を有している。この代替として、増殖能を有する肝癌由来のヘパトーマ細胞の利用が検討されているが、肝機能発現が初代肝細胞に比べ著しく低いことが問題となっている。これまでに我々は、肝機能発現を転写レベルで調節している肝特異的転写因子群を誘導可能な発現ユニットとしてヘパトーマ細胞に導入し、増殖と肝機能発現を切換え可能な細胞株（Hepa8F5）の樹立に成功した[1]。この細胞では、マウスヘパトーマ細胞である Hepa1-6 細胞に、肝特異的転写因子 HNF（hepatocyte nuclear factor）ファミリー及び C/EBP（CCAAT/enhancer binding protein）ファミリーに属する８種類の転写因子の遺伝子を、ドキシサイクリン（Dox）により誘導可能な発現ユニットとして組み込んでおり、Dox 添加によって導入した肝特異的転写因子の高発現が誘導されると、細胞形態が変化するとともに速やかに増殖が停止し、アルブミン分泌、アンモニア除去能、尿素合成能、チトクローム P450 活性といった各種肝機能が初代肝細胞に匹敵するレベルまで誘導される[1]。本発表では、Hepa8F5 細胞の肝機能発現を加速させるために、Dox 添加による肝機能発現誘導における低分子薬剤の添加の効果を検討した。低分子薬剤としては、細胞ゲノムのエピジェネティックな変化を誘導することが報告されているトリコスタチン A、酪酸ナトリウム、アピシジン、バルプロ酸ナトリウム、５アザシチジンを用いた。それぞれの薬剤で細胞に対するダメージが少ない濃度を決定し、Hepa8F5 細胞の Dox 添加による肝機能発現誘導における効果を調べたところ、トリコスタチン A と酪酸ナトリウムの添加で培養３日目において未添加なものと比べてアルブミン分泌能の顕著な増加が認められた。培養５日目ではさらにアルブミン分泌能が向上したが、薬剤添加による違いはほぼなくなり同レベルとなった。他の肝機能であるアンモニア除去能やチトクローム P450 活性においても同様の発現誘導の加速が認められた。さらにアスコルビン酸添加との併用を試みたところ、トリコスタチン A とアスコルビン酸の共添加において肝機能誘導の加速だけでなく発現レベルのさらなる増大が認められた。
[1] H. Yamamoto et al., *Biochem. Eng. J.* **60**, 67-73 (2012).

hepatoma, liver function, small molecule

発表責任者：上平正道（kamihira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：2J30p16
講演日時：3 月 18 日 18:05～ J 校舎 30 会場

ポリγグルタミン酸イオンコンプレックス（ＰＧＡＩＣ）の微細構造と安定性
Structure and durability of antimicrobial coatings from PGAIC
○白米 優一[1]、東内 遥菜[2]、芦内 誠[1,2] ([1]愛媛大連農、[2]高知大農)
○Yuichi Hakumai[1], haruna Higashiuchi[2], Makoto Ashiuchi[1,2] ([1]Ehime Univ., [2]Kochi Univ.)

【背景】ポリγグルタミン酸（ＰＧＡ）は高性能化成ナイロンの主鎖構造を備えた環境新素材としてその応用が期待されている。最近、我々はＰＧＡと歯磨き粉の薬用成分hexadecyl pyridinium cation（ＨＤＰ$^{+}$）からなる超分子プラスチック新素材「ＰＧＡＩＣ」の合成に成功した。該新素材はＰＧＡ由来の接着性や、化学的耐久性、抗菌／抗ウイルス活性を有することが先行研究から明らかにされている。一方、好塩アーキアの立体規則性Ｌ-ＰＧＡと、立体規則性を欠く納豆菌由来のＤＬ-ＰＧＡを基材とした場合、かかるＰＧＡＩＣの性能（プラスチック性や表面付着性等）に大きな違いが生じる。実際、前者のＬ-ＰＧＡＩＣでは約６０℃の融点（$Tm$）と２１０℃の熱分解開始点（$Td$）を示すのに対し、後者のＤＬ-ＰＧＡＩＣには融点は認められず、－３℃付近にガラス転移点（$Tg$）と示唆される吸熱ピークが検出されるのみであった。今回、両者の結晶性や構造の違いに注目し、性能差を生じる要因について調査したので報告する。
【結果・考察】Ｌ-ＰＧＡＩＣとＤＬ-ＰＧＡＩを広角Ｘ線回折（ＷＡＸＳ）及び小角Ｘ線回折（ＳＡＸＳ）分析に供し、両者の結晶化度やその微細構造について調べた。まず、ＷＡＸＳプロファイルに着目したところ、Ｌ-ＰＧＡＩＣには結晶性を示す複数のピークが認められたのに対し、ＤＬ-ＰＧＡＩＣでは非晶性ピークが大きかった。この結果は高分子の密集度の違いを示唆するものであり、その度合いが基材として用いたＰＧＡの立体規則性によって支配されることを見いだした。次いで、ＳＡＸＳの散乱ピークを解析したところ、前者の結晶部はラメラ構造を示唆する周期性を示す一方、後者はラメラ構造と体心立方（Ｑｕｂｉｃ）構造が混在する不規則構造であることが判明した。これにより、Ｌ-ＰＧＡＩＣは高結晶性の超分子材料であることが判明した。両者の接着特性についても精査した。実際、産業使用頻度の高い「水：アルコール混液」に対する耐久性は、Ｌ－ＰＧＡＩＣコーティングの方がＤＬ-ＰＧＡＩＣを使用した場合よりもはるかに優れていた。以上、前者の方が重要機能（抗菌性）の維持・安定化の目的に適う性能を保持していたことから、立体化学性を有するバイオ高分子の高機能材料化を目指すうえでキラル制御技術の充実が特に重要であるとの結論に達した。

poly-γ-glutamate, lamellar structure, durability

講演番号：2J31a01
講演日時：3 月 18 日 09:20～ J 校舎 31 会場

ブンタン葉のストレス応答反応における二次代謝物質の変動解析
Metabolic profiling of　stress related secondary metabolites in Citrus grandis leaves
○伊佐木 芳[1]、松川 哲也[1,2]、梶山 慎一郎[1]([1]近畿大院生物理工、[2]近畿大附属農場)
○ Kaoru ISAKI[1], Tetsuya MATSUKAWA[1,2], Shin'ichiro KAJIYAMA[1] ([1]BOST, Kindai Univ., [2]Experimental farm, Kindai Univ.)

［目的］　カンキツ類は古くから世界的に栽培されている商業的価値の高い果樹で、果実の保存環境や、果実に含まれる代謝産物に関する研究が数多く行われてきた。一方で、果実以外の葉や枝に関する研究は少なく、特にこれらのストレス応答に関する研究はあまり例がない。また，カンキツ類はきわめて多様性の高い植物群であるため，カンキツ類の生理に関する研究は商業的価値の高い系統に限られており，カンキツ類に共通した生理的知見は乏しいのが現状である。我々はこれまでに、数種のカンキツ類の葉において、ストレス応答時に香気成分や一次代謝成分が変動することを見いだし，さらに供試系統に共通して変動する物質が見いだされたことからこれらの物質がカンキツ類の防御応答におけるマーカー物質である可能性を示唆した。一方，ハッサクの葉からはこれまでのカンキツ類の防御物質とは異なる基本骨格を有する新規傷害誘導性物質を単離・同定してきた。一方，数種のカンキツ系統の葉において、防御応答に最も直接的に関与すると考えられる不揮発性二次代謝物質がストレス処理により変動することを見いだしたが，共通する防御応答物質を見いだすことが困難であった。そこで本研究では，カンキツ３祖先種の１種であるブンタンを対象として，LC/MS/MS を用いた不揮発性二次代謝物質の網羅的解析を行った。

[方法および結果]　実験材料として，近畿大学附属農場にて栽培されているヒラドブンタンの成熟葉を用いた。採取直後の葉に 6 mm 間隔で刺傷を与え，これを蒸留水に浮かべて 25℃、常光下で一定時間培養した試料を傷害処理葉とした。また、採取直後に 0.2 mM の SA および JA 溶液に葉柄部を浸した状態で培養した試料を SA および JA 処理葉とした。各処理葉を液体窒素中で磨砕した後、メタノールを加えて懸濁した。懸濁液を遠心分離し、上清を回収して粗抽出液とした。各処理葉の抽出液を Triple TOF (ABSCIEX)に供し，Information Dependent Acquisition 法により検出した。その結果，各処理葉より 300 個以上のピークが検出された。得られたピークデータを多変量解析に供し、数種のストレス応答性ピークを見出した。現在、各処理に応答していると考えられるピークの解析を進めており、その結果も併せて報告する。

stress related compounds, Citrus grandis, Metabolic profiling

発表責任者：梶山慎一郎（kajiyama@waka.kindai.ac.jp）

講演番号：2J31a02
講演日時：3 月 18 日 09:35～ J 校舎 31 会場

# イソキノリンアルカロイド生合成系の発現制御に関わる AP2/ERF 型転写因子群の探索

# Investigation of AP2/ERF transcription factors involved in the regulation of isoquinoline alkaloid biosynthesis

○山田 泰之、西田 昇平、佐藤 文彦（京大院生命科学）
○Yasuyuki YAMADA, Shohei NISHIDA, Fumihiko SATO (Kyoto Univ.)

キンポウゲ科のオウレン(*Coptis japonica*)が産生するイソキノリンアルカロイド (IQA)、ベルベリンの生合成系は CjWRKY1 や CjbHLH1 といった転写因子群によって制御されている[1]。一方、これらの転写因子を単独で過剰発現させたとしても、IQA 生産性の劇的な向上は見られなかった。したがって、安定した IQA 生産制御系を構築するためには、CjWRKY1 や CjbHLH1 を起点としたより高次な転写因子ネットワークの解析が必要である。我々は、ベルベリン生合成酵素遺伝子のプロモーター領域の解析から、新たに AP2/ERF 型 (以下 ERF)転写因子が機能している可能性を見出し[2]、IQA 生合成系の転写ネットワークの解明を目的に新規 ERF 転写因子の探索とその機能解析を行った。

当研究室で構築されたオウレンの EST 約 4000 配列中には 6 つの *ERF* 候補配列が存在したが、いずれもベルベリン生合成系の制御とは無関係であることが示された。そこで、ベルベリンとは異なるものの IQA を産生するケシ科のハナビシソウ（*Eschscholzia californica*)のドラフトゲノムシーケンスデータを利用し、合計 141 個の *ERF* 候補遺伝子を見出した。さらに、機能既知の ERF と合わせて作成した分子系統樹から、二次代謝生合成系との関連が高いと予想される Group IX サブファミリーに属する 12 個の ERF 転写因子を絞り込んだ。これらの *ERF* 遺伝子の多くは IQA 生産を誘導するメチルジャスモン酸 (MeJA)に対する応答性を示したことから、IQA 生合成系の制御との関連が示唆された。

これら ERF のより詳細な機能解析を進めるために、MeJA 処理したオウレン培養細胞から Group IX サブファミリーに属する 5 つの *ERF* 遺伝子を新たに単離した。これらの ERF 転写因子は、一過的ルシフェラーゼレポーターアッセイにおいてベルベリン生合成酵素遺伝子プロモーターからの転写誘導活性を有することが示された。また、dsRNA 導入により各 *ERF* 遺伝子の発現を一過的に抑制すると、ベルベリン生合成酵素遺伝子の発現量も低下していたことから、これらの ERF 転写因子群が IQA 生合成系の転写活性化因子として機能している可能性が示唆された。

1. Yamada and Sato, *Int Rev Cell Mol Biol.*, 305, 339-382 (2013)
2. Yamada et al., *Front Plant Sci.*, 7, 1352 (2016)

isoquinoline alkaloid, AP2/ERF transcription factor, transcriptional regulation

発表責任者：山田泰之（yyamada.m08@lif.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2J31a03
講演日時：3 月 18 日 09:50～ J 校舎 31 会場

コーヒーノキからのカフェイン分泌と根圏での分解動態の解析
Analysis of caffeine secretion and degradation in rhizosphere of coffee
○川上 智[1]、永山 秀佳[2]、荻田 信二郎[2]、矢崎 一史[1]、杉山 暁史[1] ([1]京都大学 生存圏研究所、[2]県立広島大学 生命環境学部)
○Tomo KAWAKAMI[1], Shuka NAGAYAMA[2], Shinjiro OGITA[2], Kazufumi YAZAKI[1], Akifumi SIGIYAMA[1] ([1]RISH. Kyoto Univ., [2]Prefectural University of Hiroshima)

コーヒーノキはコーヒーベルトと呼ばれる赤道付近の地域を中心に世界各地で栽培されており、種子から生産されるコーヒーは嗜好飲料として世界中で飲まれている。100 種を超えるコーヒーノキ属のうち、飲料として利用されているものは主に *Coffea arabica* と *C. canephora* の 2 種である。コーヒーノキは、プリンアルカロイドであるカフェインを蓄積するが、カフェインはキサントシンから 3 種の N-メチルトランスフェラーゼ（XMT、MXMT、DXMT）によるメチル化と脱リボース化によって合成される。カフェインは植物体内において虫害防御やプライミングに関与する。さらに、カフェインは落葉、落果に加え、根からも土壌中に放出され、アレロパシー効果を有することが報告されている。近年、in vitro での解析によりカフェインは *Tricoderma* 属菌の拮抗作用を向上させることが明らかになり、根圏微生物との相互作用における機能が示唆された。そこで本研究では、コーヒーノキ植物体及び培養細胞を用いて、カフェインの分泌と土壌での分解動態の解析を行った。

まず、コーヒーノキの植物体及び、培養細胞におけるカフェイン類の含量と分泌量を HPLC により解析した。その結果、種子のカフェイン含量が最も高く 26 μmol/g FW であり、花や葉には種子の約 2 分の 1 のカフェインが含まれていた。根にも約 0.02 μmol/g FW のカフェインが含まれることが明らかになった。また、カフェインは実生で根の 40%以上が分泌されたが、成長したコーヒーノキでは分泌量が減少した。カフェインの根圏での動態を調べるために、土壌中におけるカフェイン分解を解析した結果、カフェインはコーヒーノキを栽培した土壌ではダイズを栽培した土壌に比べて速やかに分解された。このことから、コーヒーノキ根圏はカフェインを分解する微生物の活性が高いことが示唆された。現在、コーヒーノキ実生と培養細胞を用いて、各種条件下でのカフェイン生合成と分泌を解析している。

coffee, caffeine, rhizosphere

講演番号：2J31a04
講演日時：3 月 18 日 10:05～ J 校舎 31 会場

土壌中の炭素、窒素量および C/N 比調節によるトマト含有成分の検討
Investigation of components of tomato fruit by adjustment of soil Total Carbon, Total Nitrogen, and C/N ratio.
○小橋 勇也[1]、アディカリ ディネッシュ[2]、荒木 希和子[1]、久保 幹[1] ([1]立命大生命、[2]SOFIX 農業推進機構)
○Yuya KOBASHI[1], Dinesh ADHIKARI[2], Kiwako S. ARAKI[1], Motoki KUBO[1] ([1]Ritsumeikan Univ., [2]SOFIX Agribusiness Promotion Association)

【背景・目的】トマト（*Solanum lycopersicum*）は、食味が良くリコピンなどの栄養が豊富な果菜として様々な料理に使用されており、その栽培方法も多岐にわたる。栽培方法には、化学肥料を用いて土壌に植物の栄養となる無機物を直接供給する方法や、有機質資材を投入し微生物の物質循環により間接的に無機物を供給する有機栽培などがある。土壌肥沃度指標（SOFIX: Soil Fertile Index）は、土壌中の微生物による物質循環に着目した土壌診断の指標であり、土壌中の成分量に加え、総細菌数と物質循環活性も数値化し評価する。微生物の数と活性は、特に、全炭素量（TC）、全窒素量（TN）、C/N 比により左右される。SOFIX 分析結果に基づき、有機質資材を用いて土壌の TC、TN、C/N 比等を調節し、総細菌数と物質循環活性を向上させた土壌で、農作物を栽培することが SOFIX に基づく農法である。これまでの SOFIX に基づく有機栽培実験において、化学肥料中心の栽培と比べて、トマトの収量が向上する結果が得られている。特に、TC 30,000 mg/kg 以上、C/N 比約 20 に調節した場合、最も収量が高かった。しかし、トマトの含有成分量を増加させる土壌環境条件は検討できていない。本研究では、トマトの収量と含有成分量が向上する最適な土壌条件を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】3 つの圃場（滋賀県守山市、各 24 $m^2$）の土壌を、魚肥を用いて一定の TC（約 30,000 mg/kg）で 3 段階の C/N 比（18、21、30）に調節した。各圃場にトマトの苗（桃太郎品種）を定植し、2 ヵ月後に収穫した。トマトの糖度、酸度、グルタミン酸濃度、リコピン濃度、水溶性抗酸化物質濃度、ポリガラクツロナーゼ活性、硝酸イオン濃度の 7 つの成分を分析した。また、圃場の土壌を採取し、総細菌数と物質循環活性の指標である窒素循環活性を分析した。その結果、土壌の窒素循環活性は C/N 比 18、21、30 の圃場の順に高かった。また、C/N 比 18 の圃場で栽培されたトマトで、水溶性抗酸化物質濃度以外の 6 つの成分が最も良好であり、次いで C/N 比 21 の条件のトマトが優れていた。例えば、リコピン濃度は C/N 比 18、21、30 の条件でそれぞれ 5.57、5.35、4.36 mg/100 g であった。糖度と酸度は C/N 比 18、21 の条件で高かった。トマトの収量は C/N 比 18 と 21 の圃場で同程度に高く、共に 2015 年夏季の全国平均（農林水産省）を上回った。これまでの研究と同様に、収量は C/N 比 20 前後で最大だったため、SOFIX に基づくトマト栽培方法はトマトの高収量を安定的に実現させることが可能であると考えられる。以上より、本研究で実施した栽培条件の中では、TC 30,000 mg/kg 以上で C/N 比が比較的低い条件（18-21）が、土壌中の微生物による物質循環を促進させ、トマトの収量と成分の向上にとって、好適な土壌環境である。

Organic cultivation, Soil bacteria, Tomato

発表責任者：久保幹（kubo@sk.ritsumei.ac.jp）

講演番号：2J31a05
講演日時：3 月 18 日 10:20～ J 校舎 31 会場

# 種子色によるコムギのフラボノイド成分の差異

# Difference in flavonoid constituents between seed coat color of wheat

○神山 紀子[1]、蝶野 真喜子[1]、中川 博之[2]、小野 裕嗣[2]、松中 仁[3]([1]農研機構作物開発センター、[2]農研機構高度解析センター、[3]農研機構九沖農研)
○Noriko Kohyama[1], Makiko Chono[1], Hiroyuki Nakagawa[2], Hiroshi Ono[2], Hitoshi Matunaka[3] ([1]Institute of Crop Science, NARO, [2]Advanced Analysis Center, NARO, [3]Kyushu Okinawa Agricultural Research Center, NARO)

【背景・目的】コムギの種子色には赤粒と白粒があり、白粒の方が小麦粉の色相が優れるが、穂発芽しやすい傾向がある。この種子色を支配する遺伝子はフラボノイド生合成の転写調節因子 *Tamyb10* であると報告されている。赤粒コムギ種皮の赤褐色色素はフラボノイドが重合したタンニンであると推定されているが、赤褐色色素及び前駆物質の同定はされていない。そこで、赤粒及び白粒コムギの完熟種子と登熟過程の種子を用い、種子色によるフラボノイド成分の差異を明らかにすることを目的とした。
【方法】2015 年産及び 2016 年産の赤粒コムギ（農林 61 号、さとのそら）、白粒コムギ（タマイズミ）とオオムギ（ファイバースノウ）の開花後 2～40 日の種子を縦断し、フラバノールと反応して青色を呈する *p*-ジメチルアミノ桂皮アルデヒド（DMACA）試薬で染色し、観察した。農林 61 号の開花後 10 日の果種皮を集めて 75%アセトンで抽出し、固相抽出カートリッジ(Supelco DPA-6S)で分画し、HPLC-ダイオードアレー検出器（LC-DAD）及び LC-MS/MS で分析し、標品との比較により含有するフラボノイドの同定を行った。また 2015 年産コムギ 3 品種の登熟中の種子中のフラボノイドを LC-DAD で定量した。
【結果及び考察】可溶性のフラバノールを含むオオムギの完熟種子は DMACA 試薬により種皮と外液が青色になるのに対し、赤粒コムギの完熟種子は種皮のみが青色に染色されたが外液は染色されず、白粒コムギは種皮も外液も変化が無かった。登熟中の赤粒コムギでは、開花後 10 日以降種皮が青色に染色され、開花後 10～15 日では外液も青緑色に変化したが、白粒コムギは登熟期間を通じて DMACA 試薬で染色されなかった。農林 61 号の開花後 10 日の果種皮抽出液を分画したところ、標品との保持時間、UV スペクトル、質量の一致から(+)－catechin、procyanidin B3、prodelphinidin B3 及びその前駆物質である dihydroquercetin、dihydromyricetin が含まれることが確認できた。赤粒コムギでは、開花後 10～15 日の種子でこれら 5 成分が検出されたが、白粒コムギでは登熟期間を通じて検出されなかった。赤粒コムギ種子に含まれる(+)－catechin、procyanidin B3、prodelphinidin B3 は、オオムギ種子に含まれる量の数十分の一と少なかった。また、フラボンの一種である saponarin は赤粒コムギと白粒コムギの両方で検出された。以上のことから、白粒コムギではフラバノールは合成されないのに対し、赤粒コムギでは登熟過程でフラバノールが合成されるが、速やかに不溶化すると推定された。

wheat, seed coat color, flavonoid

発表責任者：神山紀子（norikok@affrc.go.jp）

講演番号：2J31a06
講演日時：3 月 18 日 10:45～ J 校舎 31 会場

# 質量分析イメージングによる葉組織内部におけるグルコシノレートの可視化

# Visualization of glucosinolate distribution by mass spectrometry imaging in the internal structure of the leaf

○一瀬 智美[1]、村山 布紗[1]、藤村 由紀[1]、山崎 雄三[2]、割石 博之[1]、三浦 大典[1] ([1]九大レドックスナビ、[2]島津製作所)
○Tomomi ICHINOSE[1], Fusa MURAYAMA[1], Yoshinori FUJIMURA[1], Yuzo YAMAZAKI[2], Hiroyuki WARIISHI[1], Daisuke MIURA[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Shimadzu Corporation)

［緒言］植物は 20 万種を超える代謝物を合成し、これらの多彩な代謝物群の生合成を生育条件、また部位により厳密に制御し環境適応を可能にしている。特にアブラナ科植物では含硫黄代謝物である数十種類のグルコシノレートが合成され、微生物や昆虫に対する防御物質として機能するとともに硫黄の貯蔵機能を合わせ持つことが知られている。生育条件に応じたグルコシノレート代謝メカニズムを高度に理解するためには、時空間的に変化する代謝動態を捉えることが極めて重要である。そこで、本研究では生体分子の組織内分布情報を非標識で取得可能なマッピング法であるマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析イメージングに着目し、葉組織におけるグルコシノレート分子種の組織内分布情報の取得ならびに葉組織内部の代謝動態解析を試みた。
［材料および方法］供試試料としてシロイヌナズナ Col-0 系統の葉（発芽後 14 日）を用い、マトリックスには 9-aminoacridine を使用した。イメージング試料は蒸着後に組織上でのマトリックス再結晶化処理を行う方法により作製した。葉の向軸面、背軸面、また採材後に表皮組織を剥離した葉組織内部におけるイメージング解析を行った。さらに連続日長条件下で生育させた個体に対し 7 日間の暗処理を行い、明条件および暗条件におけるイメージング解析結果を比較した。
［結果と考察］向軸面、背軸面、葉組織内部においてそれぞれ特異的な代謝物分布画像を得た。さらに背軸面および葉組織内部のイメージング結果より得られた各代謝物ピークの MS/MS フラグメントスペクトルを用いて、構造同定を行ったところ複数の脂肪族およびインドール型グルコシノレートの同定に成功し、一度の測定で構造の異なるグルコシノレート分子種の組織内分布を可視化するに至った。また明条件と暗条件では葉組織内部におけるグルコシノレートの蓄積量に顕著な差異が認められたことにより、光条件に依存した生合成の調節機構の存在が示唆された。今後は、光環境の変化に伴うグルコシノレート生合成および分解機構の解明を進める。

mass spectrometry imaging, glucosinolate, *Arabidopsis*

発表責任者：一瀬智美（ichinose226@gmail.com）

講演番号：2J31a07
講演日時：3 月 18 日 11:00～ J 校舎 31 会場

# オオムギ属植物 *Hordeum murinum* から単離されたムリナミド類の立体化学と抗菌活性

Stereochemistry and anti-microbial activity of murinamides isolated from *Hordeum murinum*.

○宇部 尚樹[1]、上野 琴巳[2]、武田 真[3]、石原 亨[2] ([1]鳥取大院・農、[2]鳥取大・農、[3]岡山大・資源植物科学研究所)
○Naoki UBE[1], Kotomi UENO[2], Shin TAKETA[3], Atsushi ISHIHARA[2] ([1]Grad. Sch. Agric. Tottori Univ., [2]Fac. Agric. Tottori Univ., [3]Institute of Plant Science and Resources. Okayama Univ.)

【背景・目的】

植物は病原菌や害虫に対して、二次代謝産物を介した防御機構を有する。オオムギ属植物には防御関連二次代謝産物としてトリプトファン経路に由来するベンゾキサジノン類（Bx 類）やグラミンが存在する。加えて、栽培オオムギはヒドロキシ桂皮酸アミドの *p*-クマロイルアグマチン（*p*-CA）およびその二量体のホルダチン A（HA）を芽生えに蓄積することが知られている。オオムギ属は 31 種からなり、ゲノム構成から 4 つのクレード（H、Xu、Xa、および I）に大別される。各クレードの代表的な種における防御関連二次代謝産物を調べたところ、I および Xa クレードに属する種は Bx 類を、H クレードに属する種は HA を蓄積することが分かった。一方で、Xu クレードに属する種は、フェルロイルアグマチン（FA）の二量体とその類縁体であるムリナミド A、B、C（MA、MB、MC）を蓄積していた。本研究では，ムリナミド類の立体化学を調べるとともに、Bx 類、グラミンおよびヒドロキシ桂皮酸アミド二量体類の抗菌活性を調べ、オオムギ属植物における防御関連二次代謝産物の役割を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

FA および $H_2O_2$ を基質とし、西洋わさび由来ペルオキシダーゼを用いた酵素反応を行い MA と MB を合成した。キラル HPLC 分析と CD スペクトルの測定を行ったところ、ペルオキシダーゼ反応により得られた MA と MB はいずれもラセミ体であった。続いて Xu クレードの *Hordeum murinum* ssp. *glaucum* から単離した MA と MB を同様にキラル HPLC で分析した。MA は 2 つのエナンチオマーを 1：4 の割合で含んでいたのに対し、MB は一方のエナンチオマーのみであった。

また、Bx 類、グラミン、ヒドロキシ桂皮酸アミド二量体の病原菌に対する抗菌活性を調べた。細菌であるオオムギ黒節病菌 *Pseudomonas syringae* pv. *japonica* に対し、Bx 類はヒドロキシ桂皮酸アミド二量体類よりも強い生育阻害活性を示した。一方で、糸状菌のオオムギ斑点病菌 *Bipolaris sorokiniana* とムギ類赤かび病菌 *Fusarium asiaticum* には、Bx 類よりもヒドロキシ桂皮酸アミド二量体類の方が強い胞子発芽阻害活性を示した。グラミンは、いずれの病原菌にも強い活性を示さなかった。以上の結果から、オオムギ属の H および Xu クレードに属する種が獲得したヒドロキシ桂皮酸アミド二量体類の蓄積は、糸状菌に有効な防御機構であると推察された。

Hordeum, Hydroxycinnamic acid amide dimer, Benzoxazinones

講演番号：2J31a08
講演日時：3 月 18 日 11:15～ J 校舎 31 会場

# 重水素トレーサー法を利用したチャにおける 2-phenylethanol 生合成経路の解明

# Elucidation of 2-phenylethanol biosynthetic pathway in C.sinensis using deuterium-labeled tracer

○澤井 伸也[1]、阪井 直哉[1]、山下 寛人[1]、一家 崇志[2]、森田 明雄[2]、勝野 剛[3]、渡邉 修治[4]、大西 利幸[2,4,5] ([1]静大院・総合農、[2]静大農・応生化、[3]静岡県農林技研茶研センター、[4]静大院・創造、[5]静大・グリーン研)

○Shinya SAWAI[1], Naoya SAKAI[1], Hiroto YAMASHITA[1], Takashi IKKA[2], Akio MORITA[2], Tsuyoshi KATSUNO[3], Naoharu WATANABE[4], Toshiyuki OHNISHI[2,4,5] ([1]Graduate School of Integrated Science and Technology , Shizuoka University, [2]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [3]Tea Res. Center, Shizuoka Pref. Res. Inst. of Agri. and For., [4]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, [5]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University)

【背景・目的】2-Phenylethanol (2PE) は，チャ (*Camellia sinensis*)，バラ (*Rosa* × *hybrida*)，トマト (*Solanum lycopersicum*)，ペチュニア (*Petunia* × *hybrida*) などに含まれる主要な揮発成分であり，植物生態系において，2PE は花粉受粉者を誘引するシグナル分子の一つである。これまでに我々は，バラが季節に応じて異なる 2 つの生合成経路 (AT 経路と DC 経路) で 2PE を生合成することを明らかにした (Hirata *et al*., 2016)。バラは，夏季において L-phenylalanine (L-Phe) から phenylpyruvic acid (PPA), phenylacetaldehyde (PAld) を経由し 2PE が生合成する AT 経路と，冬季において L-Phe から直接 PAld を生成した後，2PE を生合成する DC 経路を有する (Hirata *et al*., 2011; Hirata *et al*., 2016)。しかし，これまでに植物における 2PE 生合成経路が AT 経路を経る報告例はバラ以外にない。そこで本研究では，植物における 2PE 生合成経路の解明を目的として，i) L-Phe 重水素標識体 (L-[$^2H_8$] Phe) を投与した様々な植物における 2PE や PAld の重水素標識体をガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) や液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) を用いた重水素標識体追跡実験，ii) 異種発現系を利用した 2PE 生合成酵素の酵素学的解析を行った。

【結果】2PE を主要な揮発性成分とするチャの苗木および懸濁培養細胞に L-Phe 重水素標識体を投与した後，L-[$^2H_8$]Phe 由来の代謝産物を有機溶媒および固相抽出カラムを用いて精製し，質量分析を行った。その結果，AT 経路を経由して生成される重水素 7 つで標識された [$^2H_7$]-2PE および DC 経路を経由して生成される重水素 8 つで標識された [$^2H_8$]-2PE を検出した。このことは，チャが 2PE を AT 経路および DC 経路を用いて生合成していることを示唆している。次に，チャにおける 2PE 生合成経路における酵素遺伝子の同定を目的として，すでにバラで報告されている芳香族アミノ酸脱炭酸酵素，AT 経路に関与する芳香族アミノ酸アミノ基転移酵素，フェニルピルビン酸脱炭酸酵素とアミノ酸相同性のある酵素遺伝子をチャ EST データベースから選抜し，チャ幼若葉からクローニングを行い，全長 cDNA を取得した。これら酵素遺伝子を大腸菌異種発現系またはタバコ-アグロバクテリウム一過的発現系を用いて異種発現を行い，その酵素学的機能について検証した。その結果，DC 経路に関与する芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 (CsAADC) が，L-Phe を PAld に代謝すること，AT 経路に関与する芳香族アミノ酸アミノ基転移酵素 (CsAAAT) が，L-Phe を PPA に，フェニルピルビン酸脱炭酸酵素 (CsPPDC) が PPA を Pald にそれぞれ代謝することを明らかにした。以上より，チャにおいて 2PE は AT 経路および DC 経路上における CsAAAT, CsPPDC, CsAADC により生合成されることを明らかにした。

2-phenylethanol, Camellia sinensis, Volatile organic compounds

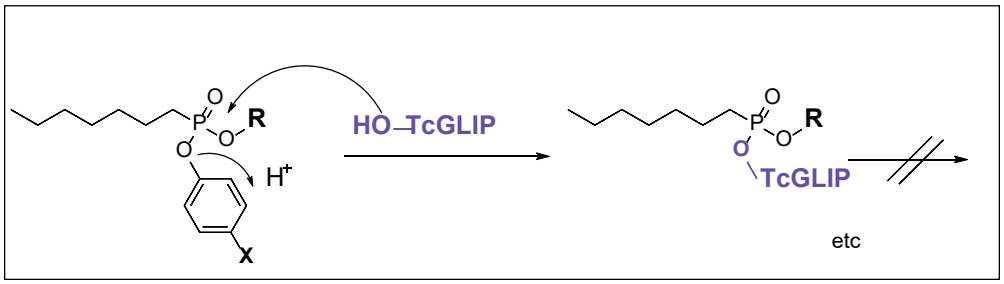
講演番号：2J31a09
講演日時：3 月 18 日 11:30～ J 校舎 31 会場

# 除虫菊で神経作用性化合物ピレスリンを合成する GDSL リパーゼの阻害剤の設計と結晶化

# Design of inhibitors and crystallization of TcGLIP, a GDSL lipase catalyzing pyrethrin biosynthesis in *Tanacetum cinerariifolium*

○松田 一彦[1]、山崎 智穂子[1]、高松 元紀[1]、伊原 誠[1]、平竹 潤[2]（[1]近大農、[2]京大化研）
○Kazuhiko MATSUDA[1], Chihoko YAMAZAKI[1], Genki TAKAMATSU[1], Makoto IHARA[1], Jun HIRATAKE[2] ([1]Fac. Agric., Kindai Univ., [2]Inst. Chem. Res. Kyoto University)

【目的】飛翔昆虫に対してとりわけ高いノックダウン活性を示す天然殺虫剤ピレスリンは除虫菊(*Tanacetum cinerariifolium*)の花部に著量蓄積される。我々は、ピレスリンの酸部とアルコール部を連結する酵素を除虫菊の蕾から精製し、その配列をもとに本酵素の遺伝子を単離した。本酵素は GDSL リパーゼ・エステラーゼの一種であることから、TcGLIP と命名した。TcGLIP の基質認識のメカニズムと除虫菊中での役割を理解するため、不可逆的阻害剤を設計し（下図）、それらの阻害活性を求めた。また本研究と並行して、TcGLIP の精製・結晶化法を改良したので報告する。




【方法と結果】リン原子の置換基の一つを炭素数 7 のアルキル基に固定し、第 2 の置換基として *p*-nitrophenyl 基を、第 3 の置換基として直鎖あるいは環状アルキル基または pyrethrin 類に類似の置換基をもつリン酸エステル類を設計･合成した。これらを MBP 融合タンパク質として発現させた TcGLIP に対して試験したところ、ピレスリンに類似の構造をもつ置換基を導入した化合物が高い阻害活性を示したことから、本置換基と TcGLIP との相互作用が示唆された。

TcGLIP と基質との相互作用のメカニズムを詳細に理解するため、MBP を除いた TcGLIP の精製法と結晶化について検討した。すなわち、大腸菌で TcGLIP をマルトース結合タンパク質（MBP）との融合タンパク質として発現させ、これをアミロースレジンと陰イオン交換クロマトグラフィーを組み合わせて精製した。次いで､MBP-TcGLIP 間の結合をプロテアーゼの処理により完全に切断したのち、陰イオン交換クロマトグラフィーによって TcGLIP を精製したところ、本酵素は Superdex 200 カラムを用いたゲルろ過で単一のピークとして溶出された。このように調製した TcGLIP を塩類やポリマーとともに混合してインキュベートしたところ、均一な形状を示す結晶が生成した。

Pyrethrin, GDSL lipase, chemical regulation

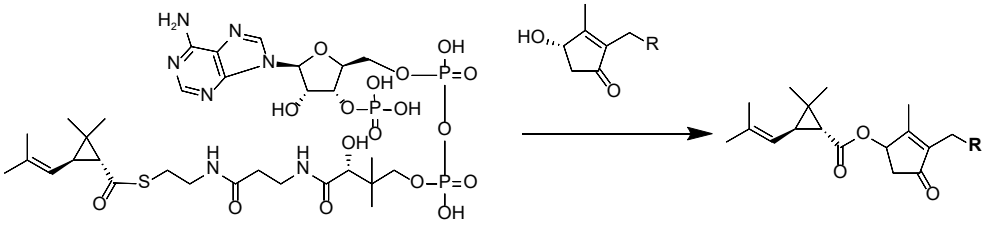
発表責任者：松田一彦（kmatsuda@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：2J31a10
講演日時：3 月 18 日 11:45～ J 校舎 31 会場

ピレスリン生合成を触媒する除虫菊 GDSL リパーゼ TcGLIP による天然基質の構造認識
Recognition of natural substrate structures of TcGLIP, a GDSL lipase from *Tanacetum cinerariifolium* catalyzing pyrethrin biosynthesis

○髙松 元紀[1]、山﨑 智穂子[1]、伊原 誠[1]、松尾 憲忠[1,2]、松田 一彦[1] ([1]近大農、[2]関学理工)
○Genki TAKAMATSU[1], Chihoko YAMAZAKI[1], Makoto IHARA[1], Noritada MATSUO[1,2], Kazuhiko MATSUDA[1] ([1]Fac. of Agri., Kindai Univ., [2]Sch. Sci. Tech., Kwansei Gakuin Univ.)

【目的】ピレスリンは除虫菊(*Tanacetum cinerariifolium*)が生合成する天然殺虫剤であり、中央部にエステル構造をもつ。ピレスリンの酸部（chrysanthemic acid と pyrethric acid）とアルコール部（pyrethrolone、cinerolone、jasmololone）はそれぞれ MEP 経路とオキシリピン経路で生合成され、最後に菊酸の CoA エステルからレスロロンへのアシル基転移反応により結合し、ピレスリンが生成する。この最後のアシル基転移反応を触媒するのが GDSL-リパーゼ・エステラーゼの一種 TcGLIP である。これまで TcGLIP が基質選択性を示すことを確認しているものの、酸部とアルコール部を構成する各部分構造を本酵素がどの程度厳密に認識しているのか検討していなかった。本研究では、強力な TcGLIP 特異的阻害剤の開発を見据えて、TcGLIP の基質特異性について詳細に解析したので報告する。



【方法と結果】TcGLIP はマルトース結合タンパク質（MBP）との融合タンパク質として大腸菌で発現させ、アミロースレジンで部分精製したのち、陰イオン交換クロマトグラフィーで精製することにより、SDS-PAGE で単一のバンドおよびゲルろ過で単一のピークを示す組換え TcGLIP を得た。また必要に応じてこの MBP-TcGLIP 融合酵素から MBP をプロテアーゼの処理により除いた。組換え TcGLIP の活性は各基質との反応で生じるエステル類を HPLC で定量することにより測定した。

Phenethyl thiol 等の thiol 類と第一菊酸のエステル類を天然基質(*S*)-pyrethrolone とともに TcGLIP に加えてもエステル合成反応が観察されなかったことから、同じ thiol であっても CoASH だけがもつ特有の構造が本酵素との相互作用において重要な役割を果たしていることが示唆された。また、アシル供与体を chrysanthemoyl CoA に固定し、アルコールとして(*S*)–pyrethrolone より側鎖が 2 炭素短い(*S*)-allethrolone や天然基質の(*R*)-エナンチオマーを加えた場合にも、本酵素は低い合成活性を示した。このことから、アルコール基質の側鎖末端の構造とヒドロキシ基の絶対配置も TcGLIP によって厳密に認識されていることが明らかとなった。

GDSL lipase, pyrethrin biosynthesis, rethrolone

発表責任者：松田一彦（kmatsuda@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：2J31p01
講演日時：3 月 18 日 14:00～ J 校舎 31 会場

# ペチュニア花弁で高発現する輸送体遺伝子の組織・時期特異的な発現解析

# Spatial and temporal expression profiles of transporter genes in Petunia

○天野 郁子[1]、肥塚 崇男[2]、鈴木 秀幸[3]、士反 伸和[1]（[1]神薬大、[2]山口大・創成科学、[3]かずさ DNA 研）
○Ikuko AMANO[1], Takao KOEDUKA[2], Hideyuki SUZUKI[3], Nobukazu SHITAN[1] ([1]Kobe Pharma Univ., [2]Yamaguchi Univ., [3]Kazusa DNA Res. Inst.)

植物の環境適応の一つとして、受粉媒介者の誘引と効率的な種子形成を目的とした花弁（limb）からの香気成分の放出が知られている。これまでに、香気成分の生合成など花弁におけるさまざまな代謝に関する研究が進められてきているが、その過程での細胞間・細胞内オルガネラ間の代謝産物の輸送に関する知見は少ない。本研究では、ペチュニアを材料に、RNA-seq 解析から花弁に高発現することが示唆された輸送体遺伝子に着目し、それらの組織発現、開花に伴う時期特異的な発現変化を解析した。

開花期のペチュニア（*Petunia axillaris* subsp. *parodii*）から leaf、stem、tube、sepal、limb、pistil、stamen をサンプリングし、RNA を抽出した。Leaf と limb を用いた RNA-seq 解析から、limb で比較的に発現が高い輸送体遺伝子の探索を行った。ReverTra Ace（TOYOBO）を用いて各組織の RNA から cDNA を作成し、それぞれの遺伝子に特異的なプライマーおよび、TOYOBO KOD SYBR qPCR Mix（TOYOBO）を用いたリアルタイム PCR により、それぞれの遺伝子のペチュニア各組織や開花時期での発現を定量的に評価した。

RNA-seq 解析から、limb で発現が高いと期待される 6 つの輸送体遺伝子を見出した。現在までに、そのうち 5 つの輸送体（Contig no. 3171、31991、28220、5960、19148）に対して発現解析および系統樹解析を行った。アミノ酸配列から相同性検索をしたところ、No. 3171 と 31991 は 7 回膜貫通型で糖の輸送体として知られる SWEET 輸送体ファミリーに属していた。No. 3171 はグルコース輸送体である AtSWEET1 と比較的アミノ酸相同性が高く（67%）、limb や stem、tube など、また開花前期において発現が高かった。一方、No. 31991 は種子形成時に胚にショ糖を供給する AtSWEET11、12、15 などと比較的に相同性が高く（約 50%）、limb や pistil、また開花後期において高い発現を示した。No. 28220 は ABCG 輸送体ファミリーに属し、pistil の柱頭において高発現を示す NtWBC1 と相同性が高く（83%）、limb や pistil、tube において、また花弁が開いている際に高い発現を示した。No. 5960 はペプチドなど様々な基質を輸送する NPF 輸送体ファミリーに属し、なかでも植物ホルモンであるジベレリンを輸送する AtNPF3 と高い相同性を示した（72%）。また、発現は limb において高く、開花に伴い増加していた。No. 19148 は UDP-galactose 輸送体ファミリーに属し、各組織で全体的に発現していたが、中でも limb において比較的に発現が高いことを明らかとした。発表では、これら発現解析から推定される生理機能についても議論したい。

Petunia, Transporter, Flower

発表責任者：士反伸和（shitan@kobepharma-u.ac.jp）

講演番号：2J31p02
講演日時：3 月 18 日 14:15～ J 校舎 31 会場

ジャスモン酸で誘導されるタバコ NCS1 型輸送体 T408 の機能解析
Characterization of jasmonate-inducible NCS1 transporter in tobacco
○士反 伸和[1]、南 翔太[1]、津山 濯[2]、グーセンス アラン[3]、鈴木 秀幸[4]、林田 南帆[1]、高部 圭司[5]、森山 芳則[6]、矢崎 一史[7]([1]神薬大、[2]宮崎大農、[3]ゲント大、[4]かずさ DNA 研、[5]京大農、[6]岡山大薬、[7]京大生存研)
○Nobukazu Shitan[1], Shota Minami[1], Taku Tsuyama[2], Alain Goossens[3], Hideyuki Suzuki[4], Minaho Hyashida[1], Keiji Takabe[5], Yoshinori Moriyama[6], Kazufumi Yazaki[7] ([1]Kobe Pharma Univ., [2]Miyazaki Univ., [3]Ghent Univ., [4]Kazusa DNA Res. Inst., [5]Kyoto Univ., [6]Okayama Univ., [7]Kyoto Univ. RISH)

植物は様々な生理活性物質（二次代謝産物）を生産し、その中には医薬品原料などとして用いられるものも多い。その有用性から、生合成酵素に関する研究が進められてきた結果、二次代謝産物の最終産物や、一次代謝産物を含めた生合成中間体が器官間や細胞内オルガネラ間を極めてダイナミックに移動していることが明らかになってきた。そこで、近年には二次代謝産物の輸送研究が進められ、アルカロイドやアントシアニンなどの輸送に ABC（ATP-binding cassette）輸送体や MATE（multidrug and toxic compound extrusion）輸送体などが働くことなどが示されてきている（Shitan, Biosci Biotechnol Biochem. 2016 80(7):1283-93)。しかし、細胞内オルガネラ間の代謝産物の輸送体や、その輸送能が代謝生成に果たす役割などの知見は少ない。我々は、細胞内でのオルガネラ間輸送を担う輸送体の単離と、その生理的役割の解明を目指して研究を行っている。

タバコ植物では、ニコチンは根の細胞内で、アスパラギン酸などいくつかの一次代謝産物より生合成される。タバコ BY-2 培養細胞は、通常はニコチンなどのアルカロイドを全く生産しないが、植物ホルモンのジャスモン酸を処理した際には強くアルカロイド生産が誘導される。我々はジャスモン酸処理によりアルカロイド生合成遺伝子と同様に発現誘導される輸送体 T408 に着目して解析を進めてきた。本輸送体の遺伝子をクローニングしたところ、全長約 2 kb、507 アミノ酸をコードし、12 回膜貫通型の NCS1（nucleobase cation symporter1)ファミリーに属すること、また、ウラシルやアデニンの色素体への輸送能が報告されているシロイヌナズナの AtNCS1 と約 76%のアミノ酸相同性を示すことが明らかとなった。さらに、本輸送体は根、茎、葉の各組織で発現するが、特に葉において発現が高いこと、細胞内では色素体に局在することを証明した。その機能解析を目指し、T408 を過剰発現するタバコ毛状根を作出してメタボローム解析を行ったところ、フェニルアラニンなどいくつかの代謝産物の含量がコントロールに比べて有意に増減していた。現在、さらに詳細な代謝産物の変化の解析を進めており、これら結果から推定される生理機能についても議論したい。

Tobacco, Transporter, NCS1

発表責任者：士反伸和（shitan@kobepharma-u.ac.jp）

講演番号：2J31p03
講演日時：3 月 18 日 14:30～ J 校舎 31 会場

# プラストキノン・トコフェロール生合成におけるフェノール性中間体のプラスチド取り込み輸送体の探索

# Screening of plastidial phenolic intermediate importer in plastoquinone and tocopherol biosyntheses

○棟方 涼介、杉山 暁史、矢﨑 一史（京大・生存研）
○Ryosuke MUNAKATA, Akifumi SUGIYAMA, Kazufumi YAZAKI (RISH, Kyoto Univ.)

植物において、プラストキノンは光合成における電子伝達担体、またトコフェロール（ビタミン E）は抗酸化物質として、共に生命活動に必須な機能を担うフェノール性化合物である。これらのフェノール骨格はいずれもチロシンに由来し、チロシンがまずアミノ基転移酵素によって 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸（4HPP）へと変換され、さらに 4HPP ジオキシゲナーゼによってホモゲンチジン酸（HGA）が生成する。この共通経路の後、HGA はプラストキノン又はビタミン E に特異的な代謝経路へと入る。これらの経路はサイトゾルとプラスチドにまたがっており、サイトゾルで生成した 4HPP 又は HGA が下流の酵素群が局在するプラスチドへと輸送されるが、その輸送機構については全くの未知であった。

そこで本研究では、プラストキノン・トコフェロール生合成におけるフェノール性中間体の細胞内動態を明らかにすることを目的とし、4HPP 及び HGA のプラスチド内向き輸送体に着目した。従来、4HPP や HGA のみならず、植物においてフェノール類のプラスチド取り込みを担う輸送体は不明である。そこで、カイワレダイコンより調製した無傷葉緑体を用いて本輸送の生化学的な性質を調べている。

また、本輸送体遺伝子がプラストキノン・トコフェロール生合成関連遺伝子群と類似した発現パターンを示す可能性を考え、これらをクエリーとして ATTED-II による共発現解析を行った。その結果、クエリーの遺伝子群が形成する共発現ネットワークの中に、プラスチド局在の輸送体遺伝子が 6 個見いだされた。

plastoquinone, plastid, transporter

発表責任者：棟方涼介（ryousuke_munakata@rish.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2J31p04
講演日時：3 月 18 日 14:45～ J 校舎 31 会場

チューリップにおけるチューリッポシド B 変換酵素の分子多様性：根由来アイソザイムの同定
Molecular diversity of tuliposide B-converting enzyme in tulip: Identification of the isozyme from roots
○野村 泰治、上野 綾香、加藤 康夫（富山県大・生工研セ）
○Taiji NOMURA, Ayaka UENO, Yasuo KATO (Biotechnol. Res. Cent., Toyama Pref. Univ.)

【目的】チューリップ組織中に著量含まれるグルコースエステル、チューリッポシド(Pos)類(6-PosA、6-PosB) はチューリップの主要二次代謝産物であり、これらはチューリップ組織内在の PosA 変換酵素（tuliposide A-converting enzyme; TCEA）および PosB 変換酵素（TCEB）によって、抗菌活性物質であるアグリコンのラクトン化体、チューリッパリン(Pa) A および PaB へとそれぞれ変換される。TCEA および TCEB はカルボキシルエステラーゼファミリーに属するが、Pos 類の加水分解反応は一切触媒せず、分子内エステル転移によるラクトン形成反応のみを触媒するユニークな酵素である。TCEA については、球根と花弁から酵素精製および酵素遺伝子（*TgTCEA*）の同定が行われた結果、組織によって異なる TCEA アイソザイムが発現していることが明らかになっている。ごく最近、我々はチューリップ花粉からの TCEB の精製および酵素遺伝子（*TgTCEB*）の同定に成功した。しかしながら、*TgTCEB* 遺伝子は花粉では高発現しているものの、花粉同様に粗酵素中の PosB 変換酵素活性が高い根においてはほとんど発現がみられなかったことから、TCEB についても組織によって異なるアイソザイムが発現していることが強く示唆された。本研究では、根からの TCEB の精製、酵素遺伝子の同定およびその機能解析を行い、チューリップにおける TCEB の分子多様性を明らかにすることを目的とした。
【方法と結果】チューリップ品種「紫水晶」の水耕栽培物から回収した根 250 g を凍結乾燥後、粗酵素を抽出し、酵素精製に供した。硫安分画および 4 段階のカラムクロマトグラフィーを経ることで、TCEB を精製倍率 119 倍で均一に精製した。精製酵素は先に精製された花粉由来 TCEB と同様にホモ二量体酵素であったが、サブユニット分子質量は両者で明らかに異なっていた。本酵素の反応効率（$V_{max}/K_m$）は 6-PosA よりも 6-PosB に対して 110 倍高いことが確認されたが、Pos 類に対する $K_m$ 値は花粉由来酵素とは著しく異なっていた。部分アミノ酸配列解析の後、定法に従って根 mRNA から当該酵素遺伝子 cDNA（*TgTCEB-R*、R; root）を新たに単離した。TgTCEB-R の一次配列は花粉由来 TgTCEB と 80%の identity を有し、同様にカルボキシルエステラーゼファミリーに属することが確認された。また、大腸菌で発現させた組換え酵素は、天然型酵素と同様に 6-PosB をよい基質としており、さらに、本酵素がこれまでに同定された TCEA/B と同じくプラスチド局在酵素であることが確認された。*TgTCEB-R* 遺伝子の転写レベルを組織別に調べたところ、本遺伝子は根において高発現している一方で他の組織における発現は痕跡レベルであった。以上の結果から、TCEA だけでなく TCEB についても組織によるアイソザイムの使い分けがなされていることが酵素、遺伝子の両面から明らかとなった。

lactone-forming carboxylesterase, tulipalin, tuliposide

発表責任者：野村泰治（tnomura@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：2J31p05
講演日時：3 月 18 日 15:00～ J 校舎 31 会場

# トマトにおけるα-トマチン生合成に関わる A 環酸化還元酵素の解析

# Characterization of steroid dehydrogenase and reductase involved in α-tomatine biosynthesis from tomato

○李 ヒョン宰、小林 緑、中安 大、杉本 幸裕、水谷 正治 (神戸大院・農・生命機能科学)
○ Hyoung Jae Lee, Midori Kobayashi, Masaru Nakayasu, Yukihiro Sugimoto, Masaharu Mizutani (Grad. School Agric. Sci., Kobe University)

トマト (*Solanum lycopersicum*) の主要なステロイドグリコアルカロイド (SGA) である α-トマチンはトマトの未熟果実や葉、花に多く蓄積している。α-トマチンは苦味を呈し、動物や昆虫、微生物に対して毒性を示すことから生体防御物質として機能すると考えられる。生合成前駆体であるコレステロールは、酸化、アミノ化、EF 環形成によりデヒドロトマチジンへと変換され、さらに、3 位酸化異性化、5α 位還元、3 位還元によりトマチジンとなり、3 位水酸基への配糖化を経て α-トマチンが生合成される。本研究では、デヒドロトマチジンからトマチジンへの変換に関わるステロイド A 環酸化還元酵素を解明することを目的とした。トマチン生合成遺伝子との共発現解析から、*LeHSD1* と *LeS5R* を候補遺伝子として選抜した。*LeHSD1* はジギタリス (*Digitalis lanata*) の強心配糖体の生合成に関わる 3βHSD (3β-hydroxysteroid dehydrogenase) と高い相同性を示し、*LeS5R* はシロイヌナズナのブラシノステロイド 5α還元酵素である DET2 と高い相同性を示した。大腸菌発現系を用いて *LeHSD1* 組換え酵素を作製し、in vitro でデヒドロトマチジンを基質として 3 位酸化異性化活性を確認した。一方、*LeS5R* は膜タンパク質であることから、バキュロウイルス昆虫細胞発現系を用いて *LeS5R* 組換え酵素を作成した。*LeHSD1* 組換え酵素を用いてデヒドロトマチジンの 3 位酸化異性化された産物を in vitro で合成し、これを基質として *LeS5R* の 5α位還元活性を確認した。これらの結果から、*LeHSD1* はデヒドロトマチジンの 3 位酸化異性化反応を触媒し、*LeS5R* は 5α位還元反応を触媒することを明らかとした。植物体における遺伝子機能を解析するため、RNAi あるいはゲノム編集により組換えトマトと組換え毛状根を作成し蓄積代謝物を解析した結果についても報告する予定である。本研究の一部は、戦略的イノベーション創造プログラム SIP「次世代農林水産業創造技術」によって実施した。

α-tomatine biosynthesis, dehydrogenase, reductase

講演番号：2J31p06
講演日時：3 月 18 日 15:25～ J 校舎 31 会場

CRISPR/Cas9 によるジャガイモα-ソラニン生合成遺伝子のゲノム編集
CRISPR/Cas9-mediated genome editing of α-solanine biosynthetic gene in potato
○秋山 遼太[1]、中安 大[1]、李 榮宰[1]、刑部 敬史[2]、刑部 祐里子[2]、梅基 直行[3]、村中 俊哉[4]、斉藤 和季[5]、杉本 幸裕[1]、水谷 正治[1]([1]神戸大院農、[2]徳島大院生物、[3]理研 CSRS、[4]大阪大院工、[5]千葉大院薬)
○Ryota Akiyama[1], Masaru Nakayasu[1], Hyong Jae Lee[1], Keishi Osakabe[2], Yuriko Osakabe[2], Naoyuki Umemoto[3], Toshiya Muranaka[4], Kazuki Saito[5], Yukihiro Sugimoto[1], Masaharu Mizutani[1] ([1]Kobe Univ., [2]Tokushima Univ., [3]RIKEN, [4]Osaka Univ., [5]Chiba Univ.)

【目的】ナス科植物であるジャガイモには α-ソラニン、α-チャコニンといった有毒なステロイドグリコアルカロイド(SGA)が多く含まれている。SGA はコレステロールを前駆物質として生合成される。機能未知シトクロム P450 である *CYP88B1* は既知の SGA 生合成遺伝子と共発現しており、RNA 干渉法により *CYP88B1* 遺伝子発現を抑制したジャガイモでは内生 SGA 量が大きく低下することから、*CYP88B1* は SGA 生合成に関与すると推定される。さらに *CYP88B1* 発現を抑制したジャガイモではステロイドサポニンが蓄積する。ステロイドサポニンは医薬品の合成原料になる他、様々な生理活性を示す有用な化合物である。そこで、本研究では有毒 SGA から有用ステロイドサポニンへの代謝変換を目的として、CRISPR/Cas9 を用いたジャガイモ *CYP88B1* 遺伝子のゲノム編集を行った。

【結果】ジャガイモ *CYP88B1* のエクソン領域からデザインした 4 本の guideRNA を挿入した CRISPR/Cas9 ベクターを構築し *Agrobacterium rhizogenes* へ導入した。ジャガイモ茎切片に組換え *A.rhizogenes* を感染させて、形質転換毛状根を作成した。得られた形質転換毛状根からゲノム DNA を抽出し標的領域の配列解析を行った結果、*CYP88B1* に欠損変異の入った毛状根を複数ライン得ることができた。得られた *CYP88B1* ノックアウト毛状根の内生代謝物を LCMS により分析した結果、SGA は検出されず完全に消失していた。一方、窒素を含まないステロイドサポニンが多量に蓄積していた。以上の結果、CRISPR/Cas9 系を用いることにより、4 倍体ゲノムであるジャガイモのゲノム編集に成功し、*CYP88B1* ノックアウト毛状根を作製することができた。また、*CYP88B1* はステロイド骨格へのアミノ基導入過程に関与する SGA 生合成遺伝子であり、*CYP88B1* をノックアウトすることにより有毒 SGA から有用ステロイドサポニンへの代謝変換が達成された。現在、毛状根形質転換系で最も切断効率の高かったベクターを用いてジャガイモホールプラントの形質転換を行っている。

CRISPR/Cas9, Steroidal glycoalkaloids

講演番号：2J31p07
講演日時：3 月 18 日 15:40～ J 校舎 31 会場

# サンショウ油胞特異的に蓄積する揮発性テルペンの生成に関する研究

# Study on the volatile terpenes that specifically accumulate in secretory cavity of Japanese pepper

藤田 芳勧[1]、飯島 陽子[2]、相田 光宏[3]、鈴木 秀幸[4]、松井 健二[1]、○肥塚 崇男[1] ([1]山口大院農、[2]神奈川工科大応用バイオ、[3]奈良先大バイオサイエンス、[4]かずさ DNA 研バイオ研究開発)
Yoshiyuki Fujita[1], Yoko Iijima[2], Mitsuhiro Aida[3], Hideyuki Suzuki[4], Kenji Matsui[1], ○Takao KOEDUKA[1] ([1]Yamaguchi Univ., [2]Kanagawa Institute of Technology, [3]Nara Institute of Science and Technology, [4]Kazusa DNA Research Institute)

【目的】サンショウ（*Zanthoxylum piperitum*）はミカン科サンショウ属の落葉低木で、その独特の香りと辛みに加えマスキング効果があることから、香りづけや臭み消しとして日本料理に使われている。サンショウ中の主要香気成分として、limonene やβ-phellandrene, citronellal などの揮発性テルペン類が報告されているが、これら香気成分の局在性やその生合成酵素については未だ明らかになっていない。本研究では、部位や成熟段階の異なる揮発性テルペン類の定量と、テルペン合成酵素遺伝子の単離･機能解析を目的とした。
【方法および結果】ミカン科に広く見られる油胞に着目し、サンショウ葉の油胞を針で潰し、ヘッドスペース SPME 法により油胞内から放散された香気成分を捕集して GC-MS 分析を行った。その結果、20 種類以上の揮発性テルペン類が検出された。一方で、無傷の葉や油胞が見られない部位を傷つけた葉では、揮発性テルペン類がほとんど検出されたなかったことから、サンショウ葉の香気成分の多くが油胞内に特異的に蓄積していることが明らかとなった。他方、既知のテルペン合成酵素との相同性を元にしたサンショウの RNA-Seq データ解析から、3 つの遺伝子 *ZpTPS1*, *ZpTPS2*, *ZpTPS3* を選抜した。大腸菌発現系を用いて組換え酵素を作製し、*in vitro* で酵素アッセイを行った結果、farnesyl diphosphate (FPP)を基質として ZpTPS1 はβ-caryophyllene を, ZpTPS2 は germacrene D を生成した。一方、ZpTPS3 では geranyl diphosphate (GPP)を基質としてβ-phellandrene を生成する活性が検出された。同様の結果が、ベンサミアナタバコ（*Nicotiana benthamiana*）を用いた一過的な過剰発現系においても得られた。このことから、*ZpTPS1* はβ-caryophyllene を, *ZpTPS2* は germacrene D を生成するセスキテルペン合成酵素をコードし、*ZpTPS3* はβ-phellandrene を生成するモノテルペン合成酵素をコードすることが明らかとなった。さらに、サンショウ葉における *ZpTPS3* 遺伝子の転写産物の分布を *in situ* hybridization 法により解析したところ、油胞を取り囲む上皮細胞でのみ特異的に発現していた。以上の結果から、*ZpTPS3* 遺伝子は油胞特異的に蓄積している揮発性テルペン類の生成に寄与していることが示唆された。発表では、油胞の発達過程と揮発性テルペン類の化合物蓄積との関係についても議論したい。

Japanese pepper, Volatile terpene, Secretory cavity

発表責任者：肥塚崇男（takaori@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：2J31p08
講演日時：3 月 18 日 15:55～ J 校舎 31 会場

ホップにおけるリナロール／ネロリドール合成酵素の機能解析
Functional characterization of linalool/nerolidol synthase from hop(Humulus lupulus L.)
○影山 丈士[1]、杉村 哲[2]、棟方 涼介[1]、百瀬 眞幸[3]、梅基 直行[3]、小原 一朗[3]、三沢 典彦[4]、新藤 一敏[5]、矢崎 一史[1]([1]京大・生存研、[2]キリン・酒類研、[3]キリン・基盤研、[4]石川県大・生資研、[5]日女大・家政)
○Joji Kageyama[1], Tetsu Sugimura[2], Ryosuke Munakata[1], Masaki Momose[3], Naoyuki Umemoto[3], Kazuaki Ohara[3], Norihiko Misawa[4], Kazutoshi Shindo[5], Kazufumi Yazaki[1] ([1]RISH, Kyoto Univ., [2]Research Laboratories for Alcoholic Beverage Technologies, Kirin Company, Limited, [3]Central Laboratories for Key Technologies, Kirin Company, Limited, [4]Ishikawa Pref. Univ., [5]Japan Women's Univ.)

アサ科のホップ（*Humulus lupulus* L.）はビール原料として世界中で栽培され、その雌花はビールの苦味や香りにとって中心的な役割を果たしている。ホップの香りを構成する成分は数多く報告されているが、特にアロマ系ホップのマーカー化合物としては、モノテルペンのリナロールが代表である。本研究では、ホップにおけるリナロール合成酵素遺伝子の単離及びその機能解析を行っている。ホップ雌花のルプリン・リッチな部分を用いた EST 解析から、一連のモノテルペン酵素候補遺伝子をリストアップし、それらを細胞内 GPP/FPP レベルを上昇させた大腸菌をホストに順次発現させ、GC/MS 解析を行った。その結果、リナロール／ネロリドール合成酵素をコードする遺伝子を見出した。

本遺伝子は７個のエクソンと６個のイントロンで構成されているが、第１イントロン中にもう１つの開始コドンと見なされる Met が存在する。第１Met から翻訳された蛋白質はトランジットペプチドを有し、プラスチド内で MEP 経路由来の GPP からリナロールを生成すると考えられるが、第 2 Met から転写された場合は細胞質局在となり、メバロン酸経路由来の FPP を基質としてセスキテルペンのネロリドールを生成すると考えられる。GFP 融合タンパクを用いたそれぞれの遺伝子産物の植物細胞内における局在性の解析を調べた結果、実際に第１Met からの翻訳産物はプラスチドに局在し、第２Met からの翻訳産物はサイトゾルに局在することを明らかにした。

現在、両バリアントの翻訳産物の *in planta* での酵素活性を解析するため、両者をそれぞれ *Nicotiana benthamiana* に発現させ、発現葉におけるリナロール・ネロリドールの含量測定や、発現葉より調製した粗蛋白を用いた酵素活性測定を進めている。

linalool, terpene synthase, hop

講演番号：2J31p09
講演日時：3 月 18 日 16:10～ J 校舎 31 会場

# ソバ由来フラボノイド *C*-配糖化酵素の反応メカニズムの調査

# Analysis of the reaction mechanism of a flavonoid *C*-glucosyltransferase from *Fagopyrum esculentum*

○小柳 祐輔[1]、水藤 史明[2]、新井 亮一[1,3]、田口 悟朗[1,3] ([1]信州大院・理工、[2]東大院・新領域、[3]信州大・繊維)
○Yusuke KOYANAGI[1], Fumiaki SUITO[2], Ryoichi ARAI[1,3], Goro TAGUCHI[1,3] ([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Shinshu Univ., [2]Grad. Sch. Font. Sci., The Univ. of Tokyo, [3]Fac. Textile Sci. Technol., Shinshu Univ.)

【研究背景】

植物が合成するフラボノイドはその多くが配糖体として蓄積され、主に糖が酸素原子を介して結合した *O*-配糖体であるが、糖のアノメリック炭素とフラボノイドが直接炭素-炭素結合した *C*-配糖体も広く存在する。*C*-配糖体は酸や glucosidase による加水分解を受けないなど化学的に安定な化合物で、生体内で *O*-配糖体と異なる代謝特性や生理活性を示すことから近年注目されている。これら配糖体の生合成は配糖化酵素によって行われるが、*O*-配糖化酵素は立体構造および反応機構が解明されているのに対し、*C*-配糖化酵素に関する知見はほとんど得られていない。これまでに、*C*-配糖化酵素の独特な反応機構を解明することを目的として、ソバから単離した *C*-配糖化酵素（FeCGTa）の X 線結晶構造解析を行い、*C*-配糖化酵素の立体構造を明らかにしたことを報告した[1)]。この成果をもとに、*C*-配糖化の反応メカニズムの解明と *C*-配糖化酵素を *O*-配糖化酵素に転換することを目的としてさらに調査を行ったので報告する。

【方法】

FeCGTa と PDB に登録されている既知の *O*-配糖化酵素の 1 次構造および 3 次構造をアライメントし、*O*-配糖化酵素と同様に保存された、もしくは *C*-配糖化に特徴的なアミノ酸をいくつか見出だした。これらのアミノ酸残基に変異を導入した酵素を作出して、その反応性を解析・評価した。

【結果及び考察】

*O*-配糖化酵素に高く保存されている、水素受容に関わるヒスチジン残基やフラボノイド基質と水素結合を形成する酸性アミノ酸残基は FeCGTa においても保存されており、これらのアミノ酸残基に変異を導入した FeCGTa_H32I および FeCGTa_D382A では、*C*-配糖化活性が FeCGTa の 1/100 以下程度に減少した。*C*-配糖化酵素で特異的に保存されているアルギニン残基に変異を導入した FeCGTa_R280V でも、FeCGTa の 1/100 程度の活性となったほか、注目した残基のうちのいくつかは *C*-配糖化活性に関与することが示唆された。現在、*C*-配糖化酵素と *O*-配糖化酵素の転換に向けて、いくつかの変異を導入しており、その結果と併せて報告したい。

1）小柳ら（2016)、第 34 回日本植物細胞分子生物学会（上田）大会講演要旨集 p.98）

flavonoid-*C*-glycosyltransferase, flavonoid-*C*-glucoside, structure analysis

講演番号：2J31p10
講演日時：3 月 18 日 16:25～ J 校舎 31 会場

ワサビ（*Wasabia japonica*）のイソサポナリン生合成に関与する *C*-配糖化酵素の同定
Identification of a *C*-glycosyltransferase involved in the biosynthesis of isosaponarin in wasabi(*Wasabia japonica*)

○眞島 京子[1]、鈴木 秀幸[2]、田口 悟朗[1,3] ([1]信大院理工、[2]かずさ DNA 研究所、[3]信大繊維)
○Kyoko MASHIMA[1], Hideyuki SUZUKI[2], Goro TAGUCHI[1,3] ([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Shinshu Univ., [2]Kazusa DNA Res.Inst., [3]Fac.Textile Sci. Technol., Shinshu Univ.)

【背景・目的】

ワサビ（*Wasabia japonica*）はアブラナ科ワサビ属に属する植物で、その葉などにフラボノイドジ配糖体であるイソサポナリンを蓄積する。近年、イソサポナリンにコラーゲン産生促進作用が報告され、その機能性が注目されている。生合成にはフラボン骨格に対する *C*-配糖化と *O*-配糖化の 2 段階の配糖化が関与するが、ワサビにおいてそれらの反応を触媒する酵素はまだ同定されていない。また、これまでに報告された植物の *C*-配糖化酵素のほとんどは、フラバノン骨格の 2 位が水酸化された 2-ヒドロキシフラバノンを基質とするが、ワサビ粗抽出液は、2-ヒドロキシフラバノン類に対する *C*-配糖化活性を示さず、アピゲニンの 6 位を直接 C-配糖化する活性を示した。これまでに、我々はワサビの茎出葉の粗抽出画分から *C*-配糖化活性を指標に酵素の部分精製を行ったことを報告した[1)]。今回、イソサポナリン生合成に関わる *C*-配糖化反応を触媒する *C*-配糖化酵素の遺伝子同定およびその機能解析を行ったので報告する。

【方法・結果】

ワサビの茎出葉から精製したタンパク質を SDS-PAGE で分離し、ゲルろ過クロマトグラフィーで推定された、配糖化酵素に一般的なサイズである約 50 kDa 付近のタンパク質のバンド数本を切り出し、それぞれに対してペプチドマッピングを行った。得られた配列について BLAST 検索を行った結果、上記タンパク質バンドの 1 つに由来するペプチド配列が配糖化酵素と相同性を示した。それらを探索配列とし、ワサビから作出した EST データベースに対して blast 検索を行い、得られた 3 つの遺伝子を目的遺伝子の候補（WjGT1-3）とした。そのうち、WjGT1 はペプチドマッピングで得られたペプチド配列をすべて保持していた。ワサビの花/蕾由来 mRNA から作成した cDNA を鋳型としてこれら候補遺伝子の全長配列を PCR によりクローニングし、GST 融合タンパク質として大腸菌による異種宿主発現を行った。GST 精製により得られた精製酵素を用いて酵素反応を行い、生成物を HPLC/MS で解析を行った結果、WjGT1 にアピゲニンに対する *C*-配糖化活性を確認したこの酵素の基質特異性を調査したところ、最も高い反応性を示したアピゲニンの他に、ルテオリン、ケルセチン、ケンフェロール、ナリンゲニン、フロレチンなどのフラボノイドにも活性を示した。現在、本酵素の酵素学的諸性質の解析を行っており、あわせて報告したい。

[1)] 眞島ら（2016） 日本植物細胞分子生物学会（上田）大会 講演要旨集 p. 131。

*C*-glycosyltransferase, CGT, flavonoid

講演番号：2J31p11
講演日時：3 月 18 日 16:50～ J 校舎 31 会場

シロイヌナズナ由来ナリンゲニン 7-*O*-グルコース転移酵素の特性解析
Characterization of naringenin 7-*O*-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*
○窪村 有紗、大橋 貴生、長谷川 友香、三崎 亮、藤山 和仁（阪大生国セ）
○Arisa KUBOMURA, Takao OHASHI, Yuka HASEGAWA, Ryo MISAKI, Kazuhito FUJIYAMA (ICBiotech, Osaka Univ.)

【背景】
配糖体はアグリコンと呼ばれる低分子化合物に糖鎖が結合した分子構造を取る。植物体内で主に配糖体として存在するフラボノイドは構造的に多様であり、付加した糖鎖構造が物性および生物学的特性に大きく影響を与える。苦味配糖体であるナリンギンは柑橘類に豊富に存在し、抗酸化活性や血流改善効果など、医療面でも有用な働きを持つ。またナリンギンはナリンゲニンをアグリコンとして 7 位にグルコース、さらにそのグルコース残基の 2 位にラムノースが結合した分子構造をとる。本研究では、ナリンギンの分裂酵母菌体生産を目指し、ナリンゲニンの 7 位へのグルコース転移に関わるグルコース転移酵素を分裂酵母で生産し、その酵素学的特性解析を行った。
【方法】
分裂酵母様にコドン最適化したシロイヌナズナ由来ナリンゲニン-7-*O*-グルコース転移酵素（*AtGT2*）遺伝子を合成し、分裂酵母用発現ベクター pAUR224-AtGT2 および pAUR224-AtGT2-3×FLAG を構築した。分裂酵母形質転換体を 0.1 M MES（pH 6）および 0.1 μg/mL オーレオバシジン A を含有する YES 培地で培養後、ガラスビーズ法でタンパク質を抽出した。組換え AtGT2 タンパク質は CBB 染色法およびウエスタンブロッティング法により可溶性画分に発現していることを確認した。粗酵素抽出液を用いて、ナリンゲニンおよび UDP-グルコースを基質として酵素反応を行い、酵素反応生成物の逆相 HPLC 解析を行った。
【結果と考察】
酵素反応生成物の逆相 HPLC 解析の結果、AtGT2-3×FLAG および AtGT2 の両組換え酵素ともナリンゲニンの 7 位にグルコース転移活性を持つことが確認できた。より転移活性の大きかった AtGT2 を用いて、酵素学的特性解析を行った。至適 pH は pH 8.0~8.5、至適温度は 40°C であり、$Zn^{2+}$、$Mn^{2+}$、$Cu^{2+}$イオンは酵素反応に阻害的に働くことが明らかとなった。様々なフラボノイド化合物をアクセプター基質として基質特異性を調べたところ、新たにタキシフォリン、イソクエルシトリン、アビクラリンおよびヒペロシドにもグルコースを転移することが分かった。今後は、二糖目のラムノースを付加する糖転移酵素を反応系に組み込んだ、*in vivo* 反応系の構築を目指したい。

Flavonoid, Glucosyltransferase, *Schizosaccharomyces pombe*

発表責任者：藤山和仁（fujiyama@icb.osaka-u.ac.jp）

講演番号：2J31p12
講演日時：3 月 18 日 17:05～ J 校舎 31 会場

ヤマノイモ属におけるステロイドサポニン生合成の配糖化段階に関わる糖転移酵素の探索
Characterization of UGTs involved in steroidal saponin biosynthesis in *Dioscorea* plants

○中安 大[1]、李 ヒョンゼ[1]、杉本 幸裕[1]、鈴木 秀幸[2]、遠城 道雄[3]、村中 俊哉[4]、水谷 正治[1]([1]神戸大院・農、[2]かずさ DNA 研究所、[3]鹿児島大院・農、[4]大阪大院・工)
○Masaru NAKAYASU[1], Hyoung Jae LEE[1], Yukihiro SUGIMOTO[1], Hideyuki SUZUKI[2], Michio ONJO[3], Toshiya MURANAKA[4], Masaharu MIZUTANI[1] ([1]Grad. Sch. Agric. Sci., Kobe Univ., [2]Kazusa DNA Res. Inst., [3]Grad. Sch. Agric. Sci., Kagoshima Univ., [4]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

ステロイド骨格に糖が結合したステロイドサポニンは様々な生物活性をもつ天然の界面活性剤であり、植物に広く存在する。特に、ヤマノイモ属(*Dioscorea*) はステロイド製剤の合成原料として利用される 6 環性のスピロスタン構造を持つジオスゲニンをアグリコンとするサポニンを多く含む。また、ジオスゲニンの F 環が開環した 5 環性のフロスタン構造を持つサポニンも蓄積する。これらのサポニンは植物体の内生コレステロールを前駆物質として、C-16、22、26 位の酸化、C-3、26 位水酸基への糖転移など連続的な修飾により生合成されると推定されるが、生合成遺伝子および反応経路は不明である。本研究では、ヤマノイモ属のサポニン生合成遺伝子を同定することを目的とした。これまでに、サポニン高生産種のトゲドコロ(*D. esculenta*)と、比較対象として低生産種のダイジョ(*D. alata*)を材料として、次世代シークエンサーによるトランスクリプトーム解析を行い、両者の発現量の違いから生合成候補遺伝子を複数選抜した。これまでに、組換え酵素を用いた機能解析によりコレステロールの 16 位、22 位を水酸化する P450 (2016 年度大会)とフロスタン型サポニンの 26 位グリコシド結合を加水分解するβ-glucosidase (2012 年度大会)を同定した。現在は、ステロイド配糖化に関わる遺伝子の同定に向けて、候補遺伝子として計 9 種の UGT を選抜し、機能解析を進めている。本研究の一部は農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業委託事業（発展融合ステージ）によって実施した。

*Dioscorea*, steroidal saponin, UGT

発表責任者：中安　大（nakayasu@garnet.kobe-u.ac.jp）

講演番号：2J31p13
講演日時：3 月 18 日 17:20～ J 校舎 31 会場

ヤセウツボの種子発芽に特徴的なプランテオース代謝に関わる酵素の探索
Investigation of enzymes involved in planteose metabolism in germinating seeds of *Orobanche minor*

○馬場 敦也[1]、徳永 智哉[1]、木場 康介[1]、小川 拓水[1]、杉本 幸裕[2,3]、太田 大策[1]、岡澤 敦司[1,3]（[1]阪府大生環、[2]神大農、[3]JST/JICA SATREPS）
○ Atsuya BABA[1], Tomoya TOKUNAGA[1], Kosuke KIBA[1], Takumi OGAWA[1], Yukihiro SUGIMOTO[2,3], Daisaku Ohata[1], Atsushi OKAZAWA[1,3] ([1]Osaka Pref. Univ., [2]Kobe Univ., [3]JST/JICA SATREPS)

ハマウツボ科に属する根寄生植物である *Orobanche* spp., *Phelipanche* spp. および *Striga* spp. はアフリカを中心に、東ヨーロッパや西アジアにおいて農業に甚大な被害を与えている。*Orobanche* spp. および *Phelipanche* spp. は光合成能が喪失した絶対寄生植物であり、*Striga* spp. は光合成能を持つ半寄生植物である。*Striga* spp. の一部の植物種はアフリカで深刻な農業被害を与えており、年間約 70 億ドルの損失があるとも見積もられている。これらの根寄生植物は宿主への寄生を確実に行うための特殊な生活環を有している。発芽には、まず、コンディショニングという吸水期間を要し、その後、宿主から放出される発芽刺激物質を受容し発芽する。発芽後、幼根が伸長し、吸器を発達させることで宿主の根に侵入する。その後、宿主から養水分を得ることで生長し、宿主の生育を阻害する。

我々は、根寄生雑草選択的な防除法を確立するために、その特殊な発芽様式に着目した。先行研究におけるヤセウツボ (*Orobanche minor*) 種子の発芽過程の代謝プロファイリングの結果、この過程でプランテオースという三糖が減少していることが確認された。また、その代謝経路においては、まずプランテオースの加水分解によってガラクトースとスクロースが生じ、その後、スクロースの加水分解によって生じたグルコースが発芽に利用されていると予想された。さらに、根寄生植物中でのプランテオースの代謝に関わる酵素を同定し、これを標的とした阻害剤の探索を行うことで、根寄生植物選択的な防除法を確立できる可能性が示された。しかし、植物中でプランテオースの代謝に関わる酵素については知見が得られていない。そこで、本研究ではヤセウツボ中でプランテオースの加水分解を触媒すると考えられる α-ガラクトシダーゼの探索を行った。まず、発芽種子のトランスクリプトーム解析によって、ヤセウツボの α-ガラクトシダーゼ様遺伝子 (*OmAGAL*) 情報の取得を行った。この配列は種子中にプランテオースを含んでいるゴマ (*Sesamum indicum*) やタバコ (*Nicotiana tabacum*) の α-ガラクトシダーゼ配列と高い相同性を示した。さらに、OmAGAL を大腸菌で異種発現させ、α-ガラクトシダーゼのモデル基質である 4-ニトロフェニル-α-D-ガラクトピラノシドを用いて酵素活性試験を行った結果、OmAGAL が α-ガラクトシダーゼ活性を有することが確認できた。現在、OmAGAL のプランテオースに対する反応性について検討を行っている。

α-galactosidase, parasitic plants, planteose

発表責任者：岡澤　敦司（okazawa@plant.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：2J31p14
講演日時：3 月 18 日 17:35～ J 校舎 31 会場

タバコはいかにニコチンを合成するようになったのか？：二次代謝生合成系の分子進化
Genomic insights into the evolution of nicotine biosynthesis regulon in tobacco
○庄司 翼[1]、梶川 昌孝[2]、川口 治彦[1]、橋本 隆[1] ([1]奈良先端大、[2]京大生命)
○Tsubasa Syoji[1], Masataka Kajikawa[2], Haruhiko Kawaguchi[1], Takashi Hashimoto[1] ([1]NAIST, [2]Kyoto Univ.)

植物における二次代謝産物の生合成と蓄積は、生合成酵素やトランスポーターなどをコードする多数の構造遺伝子の協調的な転写制御に依存している。タバコ(*Nicotiana tabacum*)の毒性アルカロイドであるニコチンは、根で生合成され、主に葉などに蓄積する。その生合成はジャスモン酸と 2 つの遺伝子座 *NIC1* と *NIC2* により正に制御されている。タバコは２つの二倍体祖先種に由来する複二倍体種である。

全ゲノム配列の決定(Sierro et al, 2014, Nat Commun)により、ニコチン生合成の構造遺伝子と制御遺伝子に関する詳細が明らかとなった。分子系統解析と発現プロファイリングにより、ジャスモン酸応答性 ERF 転写因子により統括的にコントロールされる一群の構造遺伝子が、ニコチン生合成レギュロンを形成していることが分かった。NAD やポリアミン代謝系遺伝子の重複と発現・機能変化を伴う分子進化により、ヘテロ環形成に関与するニコチン生合成酵素遺伝子が生じてきたと推定された。ERF 転写因子、及び、共に機能する bHLH 型転写因子 MYC2 による、構造遺伝子群の転写制御は、制御される遺伝子のプロモーター領域に、これら転写因子により認識されるシス配列をより多く存在することにも反映されていた。

ERF 転写因子をコードする遺伝子は、それぞれの祖先種に由来する２つの遺伝子クラスターを構成している。それぞれのクラスターには、ニコチン生合成を制御する *ERF189* と *ERF199* が含まれている。*ERF189* を含むクラスターは *NIC2* 遺伝子座 (Shoji et al., 2010, Plant Cell)に相当し、変異アレルでは *ERF189* を含むクラスターの大部分の領域が欠失していた。

ニコチン生合成に代表される系統特異的な二次代謝系がいかに確立されてきたのかについて、転写因子が支配する生合成レギュロンへのシス配列の獲得に伴う構造遺伝子の取り込みという観点から考察する。

tobacco, nicotine, regulon

発表責任者：庄司翼（t-shouji@bs.naist.jp）

講演番号：2J31p15
講演日時：3 月 18 日 17:50～ J 校舎 31 会場

イネのフラボノイド化合物サクラネチンの生産誘導におけるジャスモン酸と フォスファチジン酸の協調作用

Synergistic effect of jasmonate and phosphatidic acid on the inductive production of flavonoid sakuraneitn in rice

○石田 明大[1,4]、小川 哲史[1]、西澤 洋子[2]、南 栄一[2]、山根 久和[3]、有村 源一郎[4]、野尻 秀昭[1]、岡田 憲典[1]（[1]東大・生物工学セ、[2]農研機構、[3]帝京大・バイオ、[4]理科大基礎工）

○ Akihiro ISHIDA[1,4], Satoshi OGAWA[1], Yoko NISHIZAWA[2], Eiichi MINAMI[2], Hisakazu YAMANE[3], Gen-ichiro ARIMURA[4], Hideaki NOJIRI[1], Kazunori OKADA[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]NIAS, [3]Teikyo Univ, [4]Tokyo Univ. of Science)

イネが生産するフラボノイドのサクラネチンは、さまざまな環境刺激により地上部で生産誘導されること、および病原菌に対して高い抗菌性を示すことから抗菌性二次代謝化合物のファイトアレキシンとして知られている。サクラネチンの生産については、植物一般に存在するフラボノイド生合成経路で合成されるナリンゲニンを前駆体として、その最終ステップにおいてナリンゲニンの 7 位がメチル化を受け生合成される。この最終ステップを触媒する酵素である Naringenin 7-*O*-methyltransferase（NOMT）をコードする遺伝子としてイネから *OsNOMT* が同定された。我々はこれまでに、サクラネチンの生産がジャスモン酸（JA）処理によって誘導されること、さらに JA 処理により *OsNOMT* が早期に発現誘導を受けることを報告した。さらに、先行研究によりリン脂質由来のホスファチジン酸（PA）の 1 つである PA-8:0 を JA と同時処理（以下、JA+PA 処理）することにより、イネ葉身でのサクラネチン生産における JA 誘導性を著しく亢進することを確認している。また、その際、JA+PA 処理したイネ葉身における NOMT の粗酵素活性は、JA 単独処理時と比べ変化がないこともわかっていることから、サクラネチン生産における JA+PA 処理の相乗的な効果は、サクラネチンの基質であるナリンゲニンの生合成ステップに作用している可能性が考えられた。本研究では、この可能性を検討するため、イネ植物に JA、PA の単独処理あるいは JA+PA 処理を行った場合のサクラネチンおよびナリンゲニン蓄積量を解析した。

まず、野生型のイネの葉身を用いた場合、JA の単独処理と比較して JA+PA 処理時にサクラネチンとナリンゲニンの蓄積量はそれぞれ顕著に増加した。次に JA 誘導的なサクラネチン生産が進まずナリンゲニンの蓄積が認められる *OsNOMT* RNAi 発現抑制株の葉身を用いて同様の実験を行った。その結果、サクラネチンについては予想通り低い蓄積量を示したが、ナリンゲニン蓄積量は JA+PA 処理の協調的な働きにより、野生型株よりも著しい増加傾向がみられた。このように、*OsNOMT* 発現抑制のためナリンゲニンが蓄積しやすい *OsNOMT* RNAi 系統を用いることで、JA+PA 処理の相乗的な作用がよりはっきりと確認でき、JA+PA 処理がサクラネチン生合成経路の上流に位置するナリンゲニン生合成ステップに作用していることが示唆された。 現在、サクラネチン生産誘導における JA+PA 処理の相乗効果が、転写レベルでの遺伝子発現量の変化に起因するのかどうかを明らかにするために、ナリンゲニン生産をになうフラボノイド代謝経路遺伝子群（*PAL*, *C4H*, *4CL*, *CHS*, *CHI* ）の転写レベルについて qRT-PCR による解析を進めている。

flavonoid, phytoalexin, phosphatidic acid

発表責任者：石田明大（8316607@ed.tus.ac.jp）

講演番号：2J31p16
講演日時：3 月 18 日 18:05～ J 校舎 31 会場

# エダマメに含まれるフラボノイド類の網羅解析
# Comprehensive analysis of flavonoids in soybean

○中村 李[1]、清水 康貴[1]、佐々木 亮介[2]、斉藤 和季[2,3]、及川 彰[1,2]（[1]山形大農、[2]理研 CSRS、[3]千葉大院薬）
○Sumomo NAKAMURA[1], Yasutaka SHIMIZU[1], Ryosuke SASAKI[2], Kazuki SAITO[2,3], Akira OIKAWA[1,2] ([1]Yamagata Univ., [2]RIKEN CSRS, [3]Chiba Univ.)

【目的】エダマメとは、マメ科（*Leguminosae*）マメ亜科（*Fraboidesae*）ダイズ属（*Glycine*）のダイズ未熟種子を指す。日本を含む東アジアの一部では、ダイズだけでなく、未熟種子段階のエダマメも食材として用いる文化がある。エダマメは豊富なタンパク質やビタミンに加えて、イソフラボンなどの多くの機能性成分を有し、健康食品としての人気も高まっている。本研究室では、これまでに、“エダマメの茹で方による成分の変動”や“収穫時の気象条件がエダマメの成分に与える影響”などの観点から、エダマメの一次代謝物を標的にメタボローム解析を行ってきた。一方、エダマメの二次代謝物を網羅的に調べた例は少ない。そこで今回は、エダマメの二次代謝物、特にフラボノイド類の網羅解析を試みた。
【方法】サンプルとして“湯上り娘”、“サヤムスメ”、“秘伝”のエダマメ 3 品種に加え、山形県鶴岡市の特産エダマメであるダダチャマメ 3 品種（“甘露”、“白山”、“尾浦”）を用いた。エダマメサンプルは、生マメと茹でマメの可食部をそれぞれ種皮とマメ（種子）に分け、凍結乾燥後粉砕し、有機溶媒で抽出した。抽出物は高速液体クロマトグラフィー（HPLC）および液体クロマトグラフィー質量分析装置（LC-MS）を用いてフラボノイド類の網羅解析に供された。
【結果】全ての品種から複数のピークが検出され、それぞれから光吸収スペクトルとマススペクトルが得られた。これらを標準品のスペクトルや代謝物データベース情報へ照会することにより、エダマメに含まれる二次代謝物の同定を行った。その結果、以前からダイズに多く含有されることが知られているイソフラボノイド類とその配糖体は全品種において検出された。そして、これらの種類・含量には品種間差異が認められ、特にエダマメ品種とダダチャマメ品種の比較においてエピカテキン含量に大きな差異が認められた。しかし、エピカテキンは茹でマメでは検出されたが、生マメでは認められなかった。また、晩生品種はケイ皮酸含量が高いという結果も得られ、早晩性によって含有される成分含量に違いが認められることも明らかになった。加えて、品種や収穫期の異なるサンプル間で、含量に差が認められた未同定物質が検出された。今後は、新たな標準品との照会や核磁気共鳴（NMR）を用いた構造解析により、この未同定物質を明らかにしたい。これらの結果をまとめることにより、山形県鶴岡市の特産品であるダダチャマメに、二次代謝物の観点からの特徴付けを行うことを目指す。

edamame, metabolome, flavonoid

発表責任者：及川彰（oikawa@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp）

講演番号：2J32a01
講演日時：3 月 18 日 09:20～ J 校舎 32 会場

根寄生雑草被害の低減を目指した ShKAI2s の機能解析
Functional analysis of KAI2 in *Striga hermonthica*
○今村 優作[1]、高橋 郁夫[1]、呂 瑩[1]、胡 文倩[1]、福井 康佑[1,2]、徐 玉群[1]、宮川 拓也[1]、中村 英光[1]、田之倉 優[1]、浅見 忠男[1] ([1]東大院・農生科・応生化、[2]岡山理科大・理)
○Yusaku IMAMURA[1], Ikuo TAKAHASHI[1], Ying LYU[1], Wenqian HU[1], Kosuke FUKUI[1,2], Yuqun XU[1], Takuya MIYAKAWA[1], Hidemitsu NAKAMURA[1], Masaru TANOKURA[1], Tadao ASAMI[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo, [2]Dept. of Biochemistry, Okayama Univ. of Science)

【背景と目的】　*Striga hermonthica* は、根寄生植物の一種であり、ソルガムなどの作物の根に寄生して収量を大きく低下させる。その被害額はアフリカ大陸を中心に年間 100 億ドルに上るともいわれており、防除法の開発は急務である。*S. hermonthica* の種子は植物の根から分泌される植物ホルモンのストリゴラクトン（SL）により発芽が誘導されるが、この機構を利用し、種子に SL を与え宿主が存在しない条件で発芽させてしまう「自殺発芽」という駆除方法が考案されている。

シロイヌナズナ KAI2 タンパク質（AtKAI2）は、種子発芽刺激物質のカリキン受容体として働くが、*S. hermonthica* においては AtKAI2 のホモログ（ShKAI2）が SL を受容するという説が提唱されている。ShKAI2 は 10 種類以上存在し、AtKAI2 と相同性が高い順に ShKAI2c、ShKAI2i、ShKAI2d という 3 つのサブクレードに分類される。本研究では、ShKAI2 の機能を利用した新たな自殺発芽誘導制御機構の発見ならびにその制御剤の探索に向けて、多様な ShKAI2 の機能解析を行った。

【方法と結果】　シロイヌナズナにおいて、KAI2 がリガンド存在下でシグナルを伝達する際、MAX2 という F-box タンパク質と複合体を形成する。これを利用し、ShKAI2 への種々の化合物の作用を簡便に評価する系として ShKAI2 と ShMAX2 の相互作用を検出する酵母 two-hybrid アッセイ系を構築し、SL および我々が合成してきた様々な SL ミミックを評価した。その結果、いずれかの ShKAI2 と ShMAX2 間の相互作用を誘導する化合物は *S. hermonthica* の種子発芽を誘導する傾向が見られた。また、化合物によって ShMAX2 と相互作用を示す ShKAI2 の種類が異なることも確認している。

シロイヌナズナやイネにおいて、SL およびそのミミックはシグナル伝達の際に加水分解されると考えられている。そこで、各リコンビナント ShKAI2 を用いて SL や SL ミミックの被加水分解性について調べている。

さらに、*S. hermonthica* 種子の発芽のためには SL 処理の前に暖かく湿った環境に数日間置くことが必要である。すなわち、暖かく湿った環境に置くと *S. hermonthica* の発芽に必要な ShKAI2 をコードする遺伝子の発現が上昇することが考えられるため、ShKAI2 をコードする遺伝子の発現量解析も行っている。本発表では、以上の *S. hermonthica* 種子発芽誘導活性、ShKAI2-ShMAX2 相互作用誘導活性、ShKAI2 による被加水分解性、発芽誘導時の遺伝子発現量という 4 つの評価系の結果を中心に報告し、各 SL ミミックの活性および各 ShKAI2 の機能について考察する。

*Striga*, KAI2, strigolactone

講演番号：2J32a02
講演日時：3 月 18 日 09:35～ J 校舎 32 会場

新規ストリゴラクトンミミックの生理活性の評価と生化学的解析
Physiological and biochemical studies of novel strigolactone mimics
○中村 英光、呂 瑩、山野 博之、喜久里 貢、姜 凱、徐 玉群、宮川 拓也、田之倉 優、浅見 忠男（東大院・応生科・農生科）
○Hidemitsu NAKAMURA, Ying LYU, Hiroyuki YAMANO, Ko KIKUZATO, Kai JIANG, Yunqun XU, Takuya MIYAKAWA, Masaru TANOKURA, Tadao ASAMI (Dept.Appl.Biol.Chem., Univ. of Tokyo)

【背景と目的】
D14 は枝分かれ抑制作用などを有する植物ホルモンであるストリゴラクトン(SL)の受容体として同定されたタンパク質であり、α / β 加水分解酵素ファミリーに属する。天然 SL は三環（ABC 環）構造とブテノライド環（D 環）がエノールエーテル結合を介して結合している。D14 が SL を受容すると、D14 は SL を加水分解し、D 環由来の反応産物を生じる。この分解活性が下流のシグナル伝達に重要であることが明らかとなっている。また、SL はアフリカの農業に甚大な被害を及ぼしている根寄生雑草の発芽誘導を行うことも知られている。KAI2 は D14 同様 α / β 加水分解酵素ファミリーに属し、種子発芽刺激物質のカリキン受容体として働くが、*S. hermonthica* においては KAI2 のホモログ（ShKAI2）が SL を受容するという説が提唱されている。作物を植える前に天然型の SL あるいは合成 SL を土壌に処理することで、いわゆる「自殺発芽」を誘導でき、根寄生雑草の作物への寄生を防ぐことができる。しかし、コストと合成手順の複雑さがこの手法の農業への応用を妨げている。そのため、本研究では活性の高さや特異性に加え、合成の簡便さも考慮した SL ミミックを合成することを目的とし、フタルイミド型 SL アナログとエステル型 SL アナログを合成し、その SL 生理活性を調べた。

【方法と結果】
本研究では既に報告されている D 環の活性発現における重要性に基づき、D 環と様々なカルボン酸誘導体をエステル結合させたエステル型化合物、および D 環とフタルイミドの窒素原子を結合させたフタル酸型化合物を新規に合成した。これらの化合物の SL 活性を評価するため、酵母 yeast-two-hybrid 法を用い、D14-SLR1 および D14-D53 の SL 依存的な相互作用を検討した。また、植物における生理活性はイネの SL 生合成変異体である *d17* 変異体の第二分げつ抑制活性によって検討した。さらに、ストライガ種子発芽を誘導する活性についても調べた。最後に、D14 および ShKAI2 による分解活性についても LC-MS や蛍光 SL プローブである Yoshimulactone G を用いて評価した。この結果、今回合成した SL ミミックの中には D14 と ShKAI2 両方に共通して認識されるものと、ShKAI2 に特異的に認識されるものが存在していたことが判明した。これらの結果をもとに、各種 SL ミミックの SL 活性と D14／ShKAI2 による分解、及び構造と生理活性の相関について議論したい。

strigolactone, karrikin, parasitic plant

講演番号：2J32a03
講演日時：3 月 18 日 09:50～ J 校舎 32 会場

ストリゴラクトン生合成における MAX1 ホモログの機能解析
Biochemical characterization of MAX1 homologs in strigolactone biosynthesis
○佐藤 智康[1]、米山 香織[2]、森 愛美[3]、齋藤 睦美[4]、謝 肖男[1,2]、秋山 康紀[3]、米山 弘一[1,2]、野村 崇人[1,2] ([1]宇都宮大院・農、[2]宇都宮大・バイオ、[3]大阪府立大院・生命環境、[4]宇都宮大・農)
○Tomoyasu SATO[1], Kaori YONEYAMA[2], Narumi MORI[3], Mutsumi SAITO[4], Xiaonan XIE[1,2], Kohki AKIYAMA[3], Koichi YONEYAMA[1,2], Takahito NOMURA[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agri., Utsunomiya Univ., [2]Ctr. for Biosci. Res. & Educ., Utsunomiya Univ., [3]Grad. Sch. of Life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [4]Fuc. of Agri., Utsunomiya Univ.)

[目的]
ストリゴラクトン（SL）は植物の枝分かれを制御する植物ホルモンである。また、根圏における SL の作用として、アーバスキュラー菌根菌の菌糸分岐誘導やストライガやオロバンキなどの根寄生植物種子に対する発芽刺激作用がある。SL 生合成経路において、all-*trans*-β-carotene は D27、CCD7 および CCD8 酵素により SL 前駆体である carlactone（CL）に変換される。これまでに我々は、シロイヌナズナのシトクロム P450 酵素 MAX1（CYP711A1）は、CL の C-19 位をカルボキシル基まで酸化して carlactonoic acid（CLA）に変換させる酵素であることを明らかにしている。一方で、イネの MAX1 ホモログの一つ（CYP711A2）は CL から SL 基本骨格をもつ 4-deoxyorobanchol（4DO）に変換させる機能があることが報告されている。本研究では、植物界において MAX1 はシロイヌナズナ型とイネ型のどちらの触媒反応が普遍的なのかを検証するために、様々な植物種の MAX1 ホモログの酵素機能を調べた。
[方法]
トマト、ポプラ、トウモロコシなどから MAX1 ホモログ遺伝子をクローニングした。MAX1 タンパク質は酵母を用いて発現させた。形質転換酵母は圧力式細胞破砕装置を用いて破壊して、遠心分離により MAX1 タンパク質が局在するミクロソーム画分を回収した。ミクロソーム画分に基質として CL を添加して反応させ、その生成物を LC-MS/MS を用いて分析した。
[結果]
調べた MAX1 ホモログのほとんどは、シロイヌナズナ MAX1 と同様に CL から CLA を生成したが、4DO は生成しなかった。イネ CYP711A2 と同じクレードにあるトウモロコシの MAX1 ホモログも 4DO は生成しなかった。したがって、CL から CLA への反応が MAX1 共通の触媒段階であり、イネ CYP711A2 による CL から 4 DO への変換は特異的な反応であると考えられる。また、イネ CYP711A2 では CL から推定 18-hydroxyCLA の生成が確認された。18-hydroxyCLA は CLA から 4 DO に変換する際の中間体であると推測される。

strigolactone, biosynthesis, enzyme

講演番号：2J32a04
講演日時：3 月 18 日 10:05～ J 校舎 32 会場

ストリゴラクトン生合成における LBO ホモログの機能解析
Biochemical characterization of LBO homologs in strigolactone biosynthesis
○依田 彬義[1]、米山 香織[2]、森 愛実[3]、Philip Brewer[4]、謝 肖男[2]、Christine Beveridge[4]、秋山 康紀[3]、米山 弘一[2]、野村 崇人[2] ([1]宇都宮大・農、[2]宇都宮大・バイオ、[3]大阪府立大院・生命環境、[4]クイーンズランド大)
○Akiyoshi Yoda[1], Kaori Yoneyama[2], Narumi Mori[3], Philip Brewer[4], Xiaonan Xie[2], Christine Beveridge[4], Kohki Akiyama[3], Koichi Yoneyama[2], Takahito Nomura[2] ([1]Fuc. of Agri., Utsunomiya Univ., [2]Ctr. for Biosci. Res. & Educ., Utsunomiya Univ., [3]Grad. Sch. of Life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [4]Queensland Univ.)

【目的】
シロイヌナズナのストリゴラクトン（SL）生合成経路において、AtD27、MAX3、MAX4 による一連の反応によりβ-カロテンから carlactone（CL）が生成される。CL はシトクロム P450 酵素の MAX1（CYP711A1）によって 19 位が酸化され carlactonoic acid（CLA）に変換される。さらに、植物体内において CLA はメチルエステル誘導体である methyl carlactonoate（MeCLA）に変換されることが明らかになっている。
シロイヌナズナにおいて、2-オキソグルタル酸依存性のジオキシゲナーゼをコードしている *LATERAL BRANCHING OXIDOREDUCTASE*（*LBO*）が新規 SL 生合成関連遺伝子として単離された。シロイヌナズナの *lbo* 変異体では CL および MeCLA が蓄積しており、LBO が CL または MeCLA を基質とする SL 生合成酵素であることが示唆された。そこで、大腸菌を用いて LBO タンパク質を発現させ、酵素画分を調製し、基質として CL, CLA, MeCLA を加えたところ、MeCLA の減少が確認された。更に、LC-MS/MS を用いて代謝物を探索したところ、MeCLA に分子量が 16 増えた化合物（MeCLA+16）が 2-オキソグルタル酸依存的に検出された。本研究では、MeCLA+16 体の構造解析およびトマトとエンドウの LBO ホモログの機能解析を行った。

【方法・結果】
LBO 代謝物の MeCLA+16 体は不安定なため機器分析による構造決定は困難であった。分子量から MeCLA+16 体は MeCLA の酸化物と推測されたので、重水素標識した MeCLA を用いて LBO タンパク質による代謝実験を行い、酸化部位の推定を行った。
トマトおよびエンドウの LBO ホモログに関しては、それぞれの cDNA をクローニングし、大腸菌を用いて LBO タンパク質を発現させた。酵素画分に基質として CL、CLA、MeCLA を加えてインキュベートした後、酢酸エチルで抽出し、LC-MS/MS 分析を行った。その結果、トマトおよびエンドウの LBO ホモログもシロイヌナズナ LBO と同様に MeCLA を基質として MeCLA+16 体を生成することが明らかとなった。

strigolactone, biosynthesis, enzyme

講演番号：2J32a05
講演日時：3 月 18 日 10:20～ J 校舎 32 会場

ミヤコグサのストリゴラクトン生合成における新規 MAX1 産物の同定
Identification of a novel MAX1 product involved in the strigolactone biosynthesis in *Lotus japonicus*.

○森 愛美[1]、米山 香織[2]、謝 肖男[2]、野村 崇人[2]、米山 弘一[2]、秋山 康紀[1]（[1]阪府大院・生命環境、[2]宇都宮大学バイオサイエンス教育研究センター）
○Narumi Mori[1], Kaori Yoneyama[2], Xiaonan Xie[2], Takahito Nomura[2], Koichi Yoneyama[2], Kohki Akiyama[1] ([1]Grad. Sch. Life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Ctr. Biosci. Res. & Educ., Utsunomiya Univ.)

【目的】ストリゴラクトン (strigolactone, SL) は植物が生産するアポカロテノイドであり，アーバスキュラー菌根菌や根寄生雑草に対する根圏情報物質として作用する。また SL は植物の枝分かれを抑制するホルモンとしても知られている。SL 生合成において，D27，CCD7，CCD8 酵素により β-カロテンからカーラクトン (carlactone, CL) が生成される。CL はイネの MAX1 ホモログのひとつである Os900 によってオロバンコール型 SL である 4-デオキシオロバンコールに変換されることが明らかなっているが，ストリゴール型の SL の骨格を形成する経路は未だに解明されていない。そこで本研究では，ストリゴール型 SL の生合成機構を解明することを目的として，ストリゴール型 SL の 5-デオキシストリゴール (5-deoxystrigol, 5DS) を主に生産し，MAX1 ホモログをただ一つしか持たないミヤコグサ (*Lotus japonicus*) に注目し，LjMAX1 の機能解析および根を用いた安定同位体ラベル化合物の取り込み実験を行った。
【方法及び結果】昨年度の本大会において，酵母異種発現系を用いた機能解析から LjMAX1 は CL を 19-ヒドロキシカーラクトン (19-hydroxycarlactone, 19-HO-CL) およびカーラクトン酸 (carlactonoic acid, CLA) に変換できるが，5DS は生成しないことを報告した。その後 MAX1 変換産物の更なる解析を進めたところ，新たに水酸化 CLA であると考えられる未知化合物を検出した。この新規 MAX1 産物を同定するために, 18-HO-CL を合成し, Os900 で酸化して LC-MS 分析に供したところ, リテンションタイムは一致した。さらに，18-ヒドロキシカーラクトン酸メチル (methyl 18-hydroxycarlactonoate, 18-HO-MeCLA) を合成し，Os900 の CL 変換産物のメチルエステル誘導体と比較したところ，これらも一致したことから新規 MAX1 産物を 18-HO-CLA であると同定した。以上の結果から, CL は LjMAX1 により 18-HO-CLA にまで変換されることが明らかになった。

続いて，ミヤコグサ根における CL や CLA の 5DS への変換過程において，18-HO-CLA が生成するのかどうかを調べた。ミヤコグサ根にフルリドン存在下で[15-$^{13}CH_3$]-CL および [16-$^{13}CH_3$]-CLA を投与したところ，両ラベル化合物は共に，[$^{13}$C]-5DS だけでなく[$^{13}$C]-18-HO-CLA にも変換されていることがわかった。

現在, 18-HO-CLA が 5DS の生合成前駆体であるかを明らかにするために, [15-$^{13}CH_3$]-18-HO-MeCLA の有機合成を行い，ミヤコグサ根への投与実験を行うとともに，ミヤコグサ植物体での 18-HO-CLA の内生の存在を明らかにすることを試みている。

strigolactone, MAX1, *Lotus japonicus*

講演番号：2J32a06
講演日時：3 月 18 日 10:45～ J 校舎 32 会場

ソラナコール型カーラクトン類のトマト MAX1 および LBO による変換
Conversion of solanacol type carlactones by SlMAX1 and SlLBO enzymes
○野上 香奈[1]、米山 香織[2]、野村 崇人[2]、米山 弘一[2]、秋山 康紀[3] ([1]阪府大・生命環境、[2]宇都宮大学バイオサイエンス教育研究センター、[3]阪府大院・生命環境)
○Kana NOKAMI[1], Kaori Yoneyama[2], Takahito Nomura[2], Koichi Yoneyama[2], Kohki Akiyama[3] ([1]Dept. Life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Ctr. Biosci. Res. & Educ., Utsunomiya Univ., [3]Grad. Sch. Life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

【目的】ストリゴラクトン（strigolactone, SL）はシュート分岐を制御する植物ホルモンであると同時に，AM 菌や根寄生雑草に対する根圏情報伝達物質としても働くアポカロテノイドである。これまでに 20 種以上の様々な構造を有する天然 SL が同定されており，これら SL のほとんどは A 環にシクロヘキサノンを有する 5-deoxystrigol（5DS）を基本骨格としている。SL は β-カロテンを出発基質とし，共通の中間体であるカーラクトン（carlactone, CL）を経て生合成されることが分かっている。ナス科に多く含まれる SL の一種であるソラナコールは A 環にベンゼン環を持つ天然 SL である。緑色硫黄細菌やある種の放線菌はソラナコールと同じ置換様式のベンゼン環を持つ芳香族カロテノイドであるイソレニエラテンを産生し，β-カロテンからイソレニエラテンへの反応を触媒する酵素をコードする遺伝子も見つかっている。よって本研究では，ソラナコールが A 環に芳香環を有した CL を中間体として生合成される可能性を検討するため，ソラナコール型の CL，カーラクトン酸（carlactonoic acid, CLA），カーラクトン酸メチル (methyl carlactonate, MeCLA) の合成法を新規に開発し，酵母と大腸菌でそれぞれ異種発現した MAX1 と LBO 酵素による変換産物の解析を行った。
【方法・結果】2,5-ジメチルフェノールを出発物質として，メチルボロン酸を用いた宮浦・鈴木カップリングを含む 7 段階の反応を経てソラナコール型 CL を合成した。9 位の炭素に関して二つの立体配置の混合物として得られたので, 逆相 HPLC により天然型と同様の *Z* 体 (**1**) を分取精製した。2,3,6-トリメチルフェノールを出発物質として，4 段階の反応を経てソラナコール型 CLA (**2**) を合成した。また，この合成のギ酸メチルと水素化ナトリウムを用いた $C_{13}$-*tert*-ブチルエステル体のホルミル化，続く D 環カップリングにおいて，エステル交換による副生成物としてソラナコール型 MeCLA (**3**) が得られた。トマトの MAX1 ホモログである SlMAX1 を酵母で異種発現し，菌体から調製したミクロソーム画分に合成した化合物 **1**～**3** をそれぞれ加え LC-MS/MS で分析したところ，**1** の **2** への酸化変換が見られたが，さらなる環化産物は確認されなかった。化合物 **2** および **3** では変換産物は見られなかった。次に，トマトの LBO ホモログである SlLBO を大腸菌で異種発現させ，粗酵素画分を用いて反応を行い，同様に分析したところ，どの化合物においても基質としての明確な消費は確認できなかったが，**3** において *O*-脱メチル化による **2** の生成が見られた。現在，SL 生合成経路においてこれらの化合物よりも下流にある代謝物として予測される 4-deoxysolanacol の合成を行うとともに，環化反応における推定中間体であるソラナコール型 18-ヒドロキシ MeCLA の合成法の開発を行っている。

strigolactone, carlactone, Solanum lycopersicum

発表責任者：秋山　康紀（akiyama@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：2J32a07
講演日時：3 月 18 日 11:00～ J 校舎 32 会場

# ストリゴラクトン受容体阻害剤の探索

# Screening for strigolactone receptor inhibitors

○久保田 真康[1]、間下 大樹志[1]、伊藤 晋作[1,2]、中村 英光[1]、浅見 忠男[1] ([1]東大院・農生科・応生化、[2]東農大・応生科・バイオ)
○Masayasu KUBOTA[1], Okishi MASHITA[1], Shinsaku ITO[1,2], Hidemitsu NAKAMURA[1], Tadao ASAMI[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo, [2]Dept. Bioscience., Tokyo Univ. of Agr.)

【目的】

ストリゴラクトン（SL）は根寄生植物の種子発芽誘導活性、植物ホルモンとしての枝分かれ抑制作用などをもつ化合物である。近年イネにおいて α/β 加水分解酵素である DWARF14（D14）が SL の受容体であることが報告され、SL との結合を介して SL シグナル伝達の負の制御因子である D53 等と相互作用することで、下流の SL シグナルを誘導すると考えられている。SL の生理作用を阻害する SL 受容体阻害剤は、作物の枝分かれ制御による収量やバイオマスの増加や、世界各地の農業生産に甚大な被害を与えている根寄生植物の防除への応用が期待される。これまでに当研究室では SL 受容体阻害剤として、D14 と SL 加水分解産物の結晶構造解析情報を用いた *in silico* スクリーニングにより選抜された 2-methoxy-1-naphthaldehyde を報告した（Mashita et al., 2016）が、生育阻害を引き起こす副作用等も認められた。そこで本研究では、新たな SL 受容体阻害活性物質の探索を目的として、酵母 two-hybrid（Y2H）法を評価系としたランダムスクリーニングを行った。

【方法と結果】

当研究室の保有する約 1 万種の化合物ライブラリーに対し、Bait として D14、Prey として D53 またはもう一つの標的タンパク質である SLR1 を用いた Y2H 法によって SL 依存的なタンパク質間相互作用の阻害活性を評価する試験を行った。16 種の化合物について D14-D53 間または D14-SLR1 間の相互作用に阻害活性を示す結果が得られたため、これらの候補化合物をイネの SL 生合成欠損変異体である *d17* の第二分げつ長を指標とした SL 枝分かれ抑制活性試験、および根寄生植物 *Striga hermonthica* の種子を用いた発芽誘導活性試験に供し、植物における SL 生理作用の阻害効果について調べた。

strigolactone, striga germination, phytohormone

講演番号：2J32a08
講演日時：3 月 18 日 11:15～ J 校舎 32 会場

STH7 Is Related to The Induction of Light-adapted Development by Strigolactone in *Arabidopsis thaliana*

○Jutiporn Thussagunpanit[1], Yuko Nagai[1], Takeshi Nakano[2], Hidemitsu Nakamura[1], Tadao Asami[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo, [2]CSRS, RIKEN)

**[Background]**

Plant development is modulated by light signals and multiple phytohormones. When plants are grown under light conditions, seedlings show light-adapted development characterized by a decrease of hypocotyl elongation, opened-cotyledons, induction of true leaf expansion and so on. In this study, we attempt to investigate the regulation of light-adapted development in *Arabidopsis thaliana* by strigolactones (SLs), karrikins (KAR), and other phytohormones.

**[Methods and Results]**

Strigolactones (SLs) have been reported to regulate light-adapted growth. GR24, a synthetic SL, and $KAR_1$, a karrikin, inhibit the hypocotyl elongation of wild-type *Arabidopsis* (WT) under weak light condition. The decreases of hypocotyl length is one of light-adapted response. Moreover, *STH7* which is a transcription factor belonging to the double B-box zinc finger subfamily was up-regulated by the supplement of both GR24 and $KAR_1$. To investigate STH7 function, *STH7*-overexpressing (*STH7ox*) and the functionally defective *STH7* (*STH7-SRDX*) mutants were used. *STH7ox* mutant showed the shorter hypocotyl elongation than WT but, *STH7-SRDX* mutant showed the longer hypocotyl elongation than WT. *STH7-SRDX* mutant was insensitive to both GR24 and $KAR_1$ on the inhibition of hypocotyl length. Furthermore, the chlorophyll and anthocyanin content was enhanced by the treatment of GR24 or $KAR_1$, and increased in *STH7*ox mutant lines. GR24 or $KAR_1$ treatment highly enhanced the content of chlorophyll and anthocyanin in *STH7*ox mutant lines, but less enhanced in WT and *STH7-SRDX* lines. Lastly, GR24 and $KAR_1$ also increased the expression level of photosynthesis-related genes *LHCB1* and *rbcS* in an *STH7*-dependent manner. These results strongly suggest that STH7 functions in the regulation photomorphogenesis of *Arabidopsis* by both SL and KAR treatment. In further experiment, we are going to study the crosstalk of SLs and other plant hormones on the light-adapted development.

strigolactone, double B-box zinc finger, photomorphogenesis

発表責任者：Jutiporn Thussagunpanit（jutiporn.thus@gmail.com）

講演番号：2J32a09
講演日時：3 月 18 日 11:30～ J 校舎 32 会場

D14 と相互作用する転写因子・NF-YC の機能解析
Studies on D14-interacting transcription factors, NF-YCs
○池上 佳菜子、高橋 郁夫、中村 英光、浅見 忠男（東大院・農生科・応生化）
○ Kanako IKEGAMI, Ikuo TAKAHASHI, Hidemitsu NAKAMURA, Tadao ASAMI (Dept.Appl.Biol.Chem., Univ.of Tokyo)

【背景と目的】
ストリゴラクトン(SL)は、根寄生植物の発芽誘導およびアーバスキュラー菌根菌の菌糸分岐誘導を行う生物間シグナルとしてのみならず、植物ホルモンとして作用することが知られている。その植物ホルモンとしての機能に関しても、枝分かれ、老化、根の成長、茎の伸長といった生長の制御、ストレス耐性への寄与など、多様であることが明らかになりつつある。近年、SL のシグナル伝達機構、特に受容機構の解明が進められており、多くの知見が蓄積されているが、シグナル伝達の下流については未解明な点も数多く残されている。私たちは、SL シグナル伝達機構の下流で働く因子を同定するため、酵母 two-hybrid system (Y2H)を用いたスクリーニングで取得した、SL シグナルにおいて中心的に働く F-box タンパク質 MAX2 と相互作用するタンパク質のうち、NF-YC ファミリーに属する 3 つの転写因子について機能解析を行っている。NF-YC は NF-Y 転写因子のサブユニットの一つで、植物は多種の NF-Y タンパク質を有しており、その機能も多岐にわたる。本研究では、SL 機能における NF-Y 転写因子の役割の解明を目的とし、NF-YC 欠損変異体と過剰発現体を用いて NF-YC の機能解析を行っている。
【方法・結果】
シロイヌナズナ cDNA ライブラリーを用いた Y2H 系によるスクリーニングで得られた 3 つの NF-YCs は MAX2 と SL 非依存的に相互作用し、SL 受容体 D14 とは SL 依存的に相互作用した。これらの候補タンパク質についてそれぞれ T-DNA 挿入変異株を入手、さらに過剰発現株を作製し、変異体の形態観察を実施したところ、過剰発現株の中には抽薹の遅延といった変化が見られたものが存在した。特にそのうちの 1 つの遺伝子過剰発現体は野生型に比べ花茎長が長く、花茎数が減少した形態を示した。この形質は、SL 生合成・受容欠損株の形質と対照的であった。また枝分かれ制御以外の SL 機能として知られる老化の促進や芽生え時の胚軸長の変化については NF-YC が関与しているデータは得られなかった。さらに、NF-YC 過剰発現株と *d14* や *max2* との二重変異体を作製し、形態観察を実施したところ、それぞれ花茎数や発芽のタイミングにおいて野生型株における過剰発現体とは異なる形質が観察された。本発表では、これらの形態観察の結果をもとに、NF-YC ファミリータンパク質の SL シグナル伝達における位置づけ、および NF-YC ファミリータンパク質による生長制御機構について考察したい。

strigolactone, NF-YC, *Arabidopsis thaliana*

発表責任者：池上佳菜子（k.ikegami13@gmail.com）

講演番号：2J32a10
講演日時：3 月 18 日 11:45～ J 校舎 32 会場

# 根寄生植物 *Striga hermonthica* 防除を目的とした合成エチレンミミックの構造活性相関と *ShETR1* の解析

# Structure-activity relationship study on synthesized ethylene mimics and analysis of ethylene receptor *ShETR1* to control a root parasitic weed *Striga hermonthica*

○水野 翼[1]、北畑 信隆[2]、鈴木 優志[1]、浅見 忠男[1] ([1]東大院・農生科、[2]東理大・理)
○Tsubasa Mizuno[1], Nobutaka Kitahata[2], Masashi Suzuki[1], Tadao Asami[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem, Univ. of Tokyo, [2]Dept. Appl. Biol. Sci., Tokyo Univ. of Science)

【背景と目的】

本研究の最終目標は、農作物生産に多大な被害を与えている根寄生植物ストライガ(*Striga hermonthica*)の防除である。本発表では目的遂行のために、①ストライガ種子の自殺発芽誘導活性を示すエチレン様化合物の探索・誘導化と、②ストライガのエチレン受容体を始めとする受容機構の解明を目指した結果について報告する。アフリカでは農作物に被害を与えるストライガの広がりが深刻な問題となっているが、その防除法として、エチレンを土壌中に注入して自殺発芽を誘導する手法が知られている。しかし、気体であるエチレンの制御が困難であることに加え、使用する薬剤が高価なため、実用化が妨げられている。①我々は、暗発芽させたシロイヌナズナに、エチレン特有の応答であるトリプルレスポンスを引き起こす KUT15 が、エチレン受容体 ETR1 に作用してエチレンシグナルを活性化することを 2015 年度の岡山大会で報告した。本研究では、KUT15 をリード化合物としてさらなる構造展開を行い、ストライガにおける発芽誘導活性を評価して実用可能性のある合成容易な化合物の探索を試みた。②これまで、ストライガにおけるエチレン受容体の塩基配列は不明なままであった。今回、シロイヌナズナエチレン受容体である *AtETR1* と相同性の高い遺伝子をクローニングすることに成功し、その塩基配列を決定して、分子系統解析や機能解析を行った。

【方法と結果】

①KUT15 は 3 つの置換基をもつトリアゾール誘導体である。今回、KUT15 をリード化合物として２つの置換基を改変し、合成した化合物のシロイヌナズナにおけるエチレン様活性と、ストライガ種子発芽誘導活性を調べた。その結果、合成化合物中にエチレン生合成中間体である ACC と同程度のストライガ種子発芽誘導活性をもつ化合物を見出した。また、シロイヌナズナとストライガでは高活性を示す化合物種が異なっていたことから、ストライガの自殺発芽誘導のための構造最適化は高等植物の老化・熟成促進剤のための構造最適化とは異なる方針で進めることの必要性が示唆された。②理化学研究所バイオリソースセンターの *Striga hermonthica* cDNA ライブラリより、シロイヌナズナエチレン受容体の配列をクエリー配列として BLAST 検索を行い、エチレン受容部位と高い相同性を持つクローンを見出した。このクローンの配列をもとに、当研究室所有のストライガよりクローニングを行い、その配列を決定した。分子系統解析により、この遺伝子は、*AtETR1* と高い相同性を示し、サブファミリー I に分類されるエチレン受容体である可能性が高いことを明らかにした。

Ethylene, *Striga hermonthica*, *ETR1*

講演番号：2J32p01
講演日時：3 月 18 日 14:00～ J 校舎 32 会場

苔類ゼニゴケにおける MpTIR1 を介したオーキシン受容機構と生理機能の解析
Analysis of Mp*TIR1*-mediated auxin reception and its physiological roles in the liverwort *Marchantia polymorpha*
○鈴木 秀政、加藤 大貴、山岡 尚平、西浜 竜一、河内 孝之（京大 生命）
○Hidemasa SUZUKI, Hirotaka KATO, Shohei YAMAOKA, Ryuichi NISHIHAMA, Takayuki KOHCHI (Grad. Sch. Biostudies, Kyoto Univ.)

**【背景・目的】**植物ホルモンオーキシンは、被子植物において転写調節を介した信号伝達により生活環を通じて多岐に渡る成長調節を行う。オーキシン受容体 F-box タンパク質 TIR1/AFB は、オーキシン依存的に転写抑制因子 AUX/IAA と相互作用して分解を促進し、AUX/IAA の相互作用因子である転写因子 ARF による転写調節を亢進させる。近年、同様のオーキシン信号伝達機構が陸上植物進化の基部に位置する苔類ゼニゴケでも保存されていることが示唆されている。ゼニゴケゲノムは制御系遺伝子の冗長性が低く、TIR1/AFB ホモログを 1 コピー（MpTIR1）、AUX/IAA ホモログを 1 コピー（MpIAA）、ARF ホモログを 3 コピー保持している。そのためゼニゴケでは、遺伝的冗長性の高い従来のモデル植物に比べ、オーキシン信号伝達とその下流因子の関係性をよりシンプルな形で理解できると期待される。本研究の目的は、ゼニゴケが被子植物と同様に TIR1/AFB を介したオーキシン受容機構を有するかを明らかにするとともに、その生理機能解析から陸上植物に共通したオーキシンの機能を明らかにすることである。
**【方法・結果】**オーキシン信号伝達における Mp*TIR1* の機能を明らかにするために、プルダウンアッセイを行ったところ、MpTIR1 はオーキシン依存的に MpIAA と相互作用することが示唆された。また、外生オーキシンに対して、Mp*TIR1* 過剰発現株は感受性上昇を示し、Mp*TIR1* 機能欠損株は耐性を示した。これらの結果から、Mp*TIR1* がオーキシン信号伝達を正に制御していることが示唆された。さらに、Cre-*lox*P により Mp*TIR1* を誘導的に欠損させることが可能な形質転換体を作出し、この背景において蛍光タンパク質で標識した MpIAA の分解調節ドメインを発現させたところ、Mp*TIR1* 欠損に伴う蛍光強度の上昇が認められ、MpTIR1 が MpIAA の分解を行うことが示唆された。以上より、MpTIR1 は被子植物と同様の機構でオーキシン受容体として機能することが示唆された。次に、Mp*TIR1* の生理機能を明らかにするため、発現解析と機能欠損株の表現型解析を行った。Mp*TIR1promoter:GUS* レポーター株を用いた解析から、Mp*TIR1* は、発芽胞子（sporeling）、成熟した葉状体、発生中の無性芽、雌器托と雄器托、未成熟な胞子体など、生活環を通じて発現していることが示唆された。Mp*TIR1* 機能欠損株は、発芽胞子から正常な葉状体へと成長せずカルス様の細胞塊として増殖した。また、Mp*TIR1* 誘導機能欠損株を用いて無性芽において Mp*TIR1* を欠損させたところ、顕著な矮化を示し、気室孔や杯状体などの器官の形成が見られなかった。これらの結果から、Mp*TIR1* が器官の発生と分化において重要な働きをすることが示唆された。

auxin signaling, *Marchantia polymorpha*, morphogenesis

講演番号：2J32p02
講演日時：3 月 18 日 14:15～ J 校舎 32 会場

苔類ゼニゴケの AMP1 および CYP78 ホモログは関連した発生調節機能を持つ
AMP1 and CYP78 homologs play related developmental functions in the liverwort Marchantia polymorpha.
○池田 敬登[1]、桐田 啓如[1]、桧原 健一郎[2]、山岡 尚平[1]、西浜 竜一[1]、河内 孝之[1] ([1]京大生命、[2]東大農学生命)
○ Hiroto IKEDA[1], Keisuke Kirita[1], Kenichiro HIBARA[2], Shohei YAMAOKA[1], Ryuichi NISHIHAMA[1], Takayuki KOHCHI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Tokyo Univ.)

植物の地上部に形成される葉や花などの組織は、茎頂分裂組織(shoot apical meristem; SAM)で形成される器官原基から細胞の機能分化を伴う形態形成の過程を経て形成される。植物の地上部はすべて SAM に由来しており、SAM の形成と維持は植物にとって非常に重要である。シロイヌナズナでは SAM の形態に異常を示す変異体として *amp1* が知られている。AMP1 はグルタミン酸カルボキシペプチダーゼのホモログであり、*amp1* 変異体は SAM の拡大や植物ホルモンの生合成量の増加といった多面的な表現型を示す。しかし AMP1 の具体的な分子機能はわかっていない。イネにおいても *AMP1* 欠損株が単離されており、葉間期が短くなることが示されている。また同様な表現型を示す変異の原因遺伝子としてシトクロム P450（CYP78A）が同定されている。本研究ではゼニゴケが保持する 2 分子種の CYP78 ホモログに着目し、MpAMP1 との関係を明らかにすることでこれらの分子の機能の解明を試みた。CRISPR/Cas9 を用いて Mp*AMP1* を欠損させたところ、細胞塊として増殖し葉状体への発生が阻害された。次に *CYP78* ホモログをそれぞれ単独で欠損させたところ、どちらも無性芽からの発生の初期段階においてメリステムが拡大する表現型を示したため、これらは機能的に重複していることが示唆された。さらに二重欠損株を作出したところ、Mp*amp1* 変異株と同様に葉状体へと発生することができず細胞塊となった。また野生株にそれぞれの *CYP78* ホモログを過剰発現させると致死であったが、Mp*amp1* 変異株背景では形質転換体が得られ、さらに葉状体様構造の形成が認められた。以上のことからゼニゴケにおいて Mp*AMP1* と 2 つの *CYP78* ホモログは同一の遺伝的経路において葉状体の発生・成長を調節することが示唆された。

Marchantia polymorpha, Cytochrome P450, meristem

発表責任者：池田敬登（ikedannu3@gmail.com）

講演番号：2J32p03
講演日時：3 月 18 日 14:30～ J 校舎 32 会場

ヒメツリガネゴケ原糸体の分化制御に関わる新奇生理活性物質の同定
Identification of novel gibberellin-like growth regulator in *Physcomitrella patens*
○宮崎 翔[1]、原 万里穂[1]、伊藤 晋作[2]、田中 啓介[3]、川出 洋[4]、林 謙一郎[5]、浅見 忠男[1]、中嶋 正敏[1] ([1]東大院・農生科、[2]東農大・応生化、[3]東農大・ゲノムセンター、[4]東京農工大院・農、[5]岡山理大・理)
○Sho MIYAZAKI[1], Mariho HARA[1], Shinsaku ITO[2], Keisuke TANAKA[3], Hiroshi KAWAIDE[4], Kenichiro HAYASHI[5], Tadao ASAMI[1], Masatoshi NAKAJIMA[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo, [2]Dept. Bio-science, Tokyo Univ. of Agric., [3]Genome Research Center, Tokyo Univ. of Agric., [4]Inst. Agric., Tokyo Univ. Agric. Technol., [5]Fac. Sci., Okayama Univ. of Sci.)

【背景・目的】　コケ植物のヒメツリガネゴケ（*Physcomitrella patens*）では、植物ホルモン・ジベレリンの生合成に必要な *ent*-カウレン合成酵素（PpCPS/KS）および *ent*-カウレン酸化酵素が機能しており、顕花植物と同様にゲラニルゲラニル二リン酸から *ent*-カウレン酸までの代謝過程が認められる[1, 2]。しかし、顕花植物と異なり *ent*-カウレン酸以降の生合成酵素が見つからず、植物体からもジベレリンは検出されない。*Ppcps/ks* 欠損変異体で原糸体の分化過程に抑制の傾向を認めたが、*ent*-カウレンあるいは *ent*-カウレン酸の投与でこの異常形質が回復したのに対し、ジベレリン投与では回復しなかった[3]。これらのことから、ヒメツリガネゴケ原糸体ではジベレリン生合成過程を中断し、未同定の代謝物が生合成され分化誘導を制御する可能性が浮上した。演者らはこの新奇生長制御物質の同定および生合成過程の解明を目的として *ent*-カウレン酸代謝物を追跡しており、本発表ではその同定状況を報告する。

【方法・結果】　当該植物材料からメタノール抽出物を調製し、逆相 HPLC を展開して得た精製画分の生物活性試験を行った結果、 *ent*-カウレン酸より高極性の代謝物を含む複数の画分を検出した[4]。次に、生合成酵素の探索を目的として次世代シークエンサを用いたトランスクリプトーム解析を行い複数の候補遺伝子を取得した。異種発現系を用いた組換え酵素試験を行った結果、候補の一つが上記代謝物の代謝反応に関わる酵素遺伝子であると判明した。これら代謝物の構造決定、植物体からの検出、および、現在作出中の関連変異体の解析結果もあわせ報告したい。

[1] Hayashi et al., FEBS Lett. 580, 6175 (2006).
[2] Miyazaki et al., FEBS Lett. 585, 1879 (2011).
[3] Hayashi et al., Plant Physiol. 153, 1085 (2010).
[4]日本農芸化学会 2016 年度大会（札幌）2H015.

moss, terpene, transcriptome

発表責任者：中嶋正敏（anakajm@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2J32p04
講演日時：3 月 18 日 14:45～ J 校舎 32 会場

# Comparative effects of ethylene inhibitors in Agrobacterium-mediated transformation of wild watermelon

○ GOITSEONE MALAMBANE[1], SATOKO NONAKA[2], SHIBA HIROSHI[2], HISASHI TSUJIMOTO[3], KINYA AKASHI[1,3] ([1]The United Graduate School of Agriculture, Tottori University, [2]Graduate school of Life and Environmental sciences, University of Tsukuba, [3]Arid Land Research Center, Tottori University)

Ethylene ($C_2H_4$), a phytohormone that is produced in response to both abiotic and biotic stresses, is an important factor in the plant-microbe interaction. It is produced from the freshly cut wounds and has shown to be a major limiting factor in successful *Agrobacterium*-mediated plant transformation. In this study, experiments were conducted to evaluate the effectiveness of ethylene inhibitors on the genetic transformation in wild watermelon. Two chemical ethylene inhibitors silver nitrate ($AgNO_3$) and aminoethoxyvinlylglycine (AVG), and a plasmid pBBRacds harboring a gene for 1-aminicyclopropane-carboxylic acid (ACC) deaminase that cleaves ethylene precursor ACC into α-ketobutyrate and ammonia, were used in the experiment. Evolved ethylene gas from the watermelon explants inoculated with *Agrobacterium* was quantified using a gas chromatography, and the results shows that explants inoculated with the *Agrobacterium* harboring pBBRacds was highly effective in suppressing ethylene accumulation in the culture vessels as the amount of ethylene gas recorded at 3-7 days after inoculation was lower as compared to the other treatments. GUS histochemical assay using pIG121-GUSint reporter gene plasmid after 7 days of co-cultivation showed that pBBRacds was more effective in transient gene expression with 46% of the explants been stained blue, followed by AVG (22%) and $AgNO_3$ (13%) treatments in wild watermelon explants. Spectrophotometric GUS enzyme assay showed a higher gene transfer in explants harboring plasmid with ACC deaminase gene as shown with a higher rate of nitrophenol production as compared to those with chemical inhibitors AVG and $AgNO_3$. Understanding the effectiveness of different ethylene inhibitors will be beneficial for improving the efficiency of the *Agrobacterium*-mediated gene transfer in crop plants of interest.

Agrobacterium gene transfer, Ethylene, ACC deaminase gene

発表責任者：AKASHI KINYA（akashi.kinya@muses.tottori-u.ac.jp）

講演番号：2J32p05
講演日時：3 月 18 日 15:00～ J 校舎 32 会場

新規エチレン様活性物質の耐性変異体の選抜
Mode of action of novel compound with ethylene like activity
○北畑 信隆[1,2]、渡辺 健志郎[1]、鈴木 優志[3]、浅見 忠男[3]、朽津 和幸[1,2] ([1]東京理科大・応用生物科、[2]東京理科大・イメージングフロンティア、[3]東大院・農生科)
○ Nobutaka Kitahata[1,2], Kensiro Watanabe[1], Masashi Suzuki[3], Tadao Asami[3], Kazuyuki Kuchitsu[1,2] ([1]Tokyo Univ. of Sci., [2]Tokyo Univ. of Sci., IFC, [3]The Tokyo Univ.)

エチレンは果実の成熟や開花促進など作物生産に重要な形質を制御しており、農業に利用されている。一方で、エチレンは気体であり、圃場での直接処理は難しい。エチレン発生剤のエテフォンなどで代用されているが、発生したエチレンの周辺環境への拡散等の問題が残されている。我々はエチレン様の活性を示す化合物を探索するため、シロイヌナズナの暗所芽生えにおける特徴的な誘導形態であるトリプルレスポンスを指標としたケミカルスクリーニング系を構築し、エチレンと同様の活性を持つ化合物 C17 を選抜した。C17 は植物にエチレン生合成を誘導せず、エチレン発生剤でもなかった。よって C17 やその誘導体は、エテフォンに代わるエチレン作用の誘導剤として有用な可能性がある。

C17 の作用機構を調べるために、エチレンシグナル経路との関係を調べた。エチレンは明所で根の伸長を阻害する。2 種のエチレン非感受性変異体 *etr1-1* 及び *ein2* に明所で C17 処理したところ、C17 はこれらの変異体の根の伸長を阻害しなかった。エチレン受容体変異体 *etr1-1* に効果を示さなかったことから、C17 はエチレン受容体、またはその制御因子を介してエチレンシグナル経路に作用している可能性がある。一方で、C17 処理とエチレン前駆体である ACC 処理で、応答性遺伝子を比較したところ、C17 処理では一部の ACC 応答性遺伝子の発現が誘導されないことから、C17 はエチレンの複雑なシグナル伝達経路を解明する上で有効なツールとなる可能性も期待される。

そこで、C17 がどのような因子を介してエチレン様の応答を誘導するのか調べるために、トリプルレスポンスを指標にして、10,000 の T-DNA タグラインから、49 ラインの C17 耐性変異体を選抜した。これらの C17 耐性変異体に ACC を処理してエチレン応答性を調べたところ、ACC に対しても耐性を示すエチレン非感受性変異体と思われるラインだけでなく、エチレン感受性だが C17 には耐性を示す変異体も単離された。C17 はこれらの因子を介してエチレンシグナル経路の一部に作用している可能性があり、原因遺伝子の同定を進めている。

ethylene, agonist, small compound

発表責任者：北畑　信隆（nobkitahata@gmail.com）

講演番号：2J32p06
講演日時：3 月 18 日 15:25～ J 校舎 32 会場

ブラシノライド様化合物のための分子設計
Molecular design for brassinolide-like compounds
○杉浦 愛理[1]、幌岩 真理[1]、青木 孝憲[1]、山上 あゆみ[2]、中野 雄司[2]、中川 好秋[1]、宮川 恒[1]([1]京大院農、[2]理研 CSRS)
○Airi Sugiura[1], Shinri Horoiwa[1], Takanori Aoki[1], Ayumi Yamagami[2], Takeshi Nakano[2], Yoshiaki Nakagawa[1], Hisashi Miyagawa[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Gene Discovery Res. Group, CSRS, RIKEN)

【目的】ブラシノライド（BL）を代表とするブラシノステロイド（BR）は，植物ステロイドホルモンであり，極微量で伸長成長や細胞分裂を促進することから，果実重量の増加をもたらす植物生長促進剤として利用ができる．また，BL は様々なストレス耐性を誘導することから，寒冷地などにおける作物栽培にも応用が期待される．しかし BR の高い合成コストが利用の障壁となっている．一方で昆虫やほ乳類のステロイドホルモンについてはその非ステロイド型アゴニストが開発され農薬，医薬として実用化された．したがって植物に関してもより簡易な構造を持つアゴニストを植物生長促進剤して，あるいはそのアンタゴニストを除草剤として応用することが可能であると考えられる．近年になって，汎用コンピューターの計算能力の向上より，バーチャルなリード（あるいはヒット）化合物の探索（インシリコスクリーニング）が容易となってきている．これまでわれわれの研究室ではこの手法を用いて BL 活性を阻害する化合物（アンタゴニスト）を発見することができた．本研究においては，BL 様活性化合物（アゴニスト）を見つけるため，アンタゴニスト（図 1）をリード化合物として構造展開し活性を評価した．
【方法】OpenEye 社のドッキングソフト FRED を用いて，リード化合物と BL 受容体（PDB:4LSX)の複合体ファイルを作成した．この複合体ともとの結晶構造に対し，AMBER を用いて MD シミュレーションを行った．シミュレーション結果を元にリード化合物の構造展開を行い，受容体との結合自由エネルギー（ΔG）を計算し，受容体と相互作用しうる化合物を合成した．化合物にはイネの第二葉身屈曲試験とシロイヌナズナの胚軸形態観察及び遺伝子発現解析により BL 様活性測定を行った．
【結果および考察】BL とリード化合物の MD シミュレーション結果からリード化合物には受容体と相互作用する BL の 2,3-OH に相当する部位がないことが観察された．このため，水素結合アクセプター，ドナー両面の働きをする置換基をリード化合物に導入したところ，計算上の結合自由エネルギー（ΔG）の改善が見られた．また植物体における活性を調べたところイネに対してわずかながら BL 様活性を観測することができた．

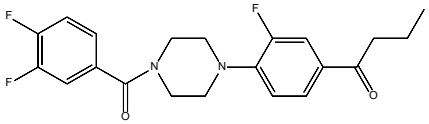


図 1:リード化合物として用いたアンタゴニスト

brassinosteroid, plant hormone, molecular design

講演番号：2J32p07
講演日時：3 月 18 日 15:40～ J 校舎 32 会場

# オオムギ矮性遺伝子 *brachytic1* の解明

# Characterization of barley dwarf gene *brachytic1*

○伊藤 歩惟、安田 歩未、山岡 康輔、堅田 雄也、上田 美奈瀬、中山 明、本多 一郎（前橋工大・生物工学)
○ Ai ITO, Ayumi YASUDA, Kousuke YAMAOKA, Yuya KATADA, Minase UEDA, Akira NAKAYAMA, Ichiro HONDA (Dept. of Biotech., Maebashi Inst. of Tech.)

## 背景

植物の草丈を低くする矮性、特に半矮性はイネやコムギ、オオムギなど禾穀類の多くの品種に取り込まれており、「緑の革命」で多大な貢献を果たした有用な形質である。半矮性遺伝子 *brachytic1(brh1)* は、オオムギ(*Hordeum vulgare* L.)において最も古くから知られ、草丈を 70%程度まで短縮する半矮性遺伝子であるが、その原因遺伝子は判明していない。本研究は *brh1* 遺伝子の解明を目的に、その生理学的解析を実施するとともに、原因遺伝子を推定、解析した。

## 結果・考察

brh1 の根はブラシノステロイド（BR）処理による伸長阻害を示さず、brh1 が BR シグナル伝達に関わっていることが示された。さらに葉の BR 反応性、暗形態形成、GA 反応性、BR、GA 含量を調査したのち、類似の生理的特徴を示すイネを検索したところ、brh1 はイネ大黒矮性（d1）と類似していることが明らかになった。

イネ *d1* 遺伝子はヘテロ三量体 G タンパク質 α サブユニットをコードする。オオムギゲノムデータベースで Gα の座乗位置を調査したところ、Gα は既知の *brh1* の座乗位置の極めて近傍に位置することが明らかになった。

5 系統の *brh1* アリルの Gα を含むゲノム領域を解析したところ、2 系統では、想定エキソン領域にストップコドンにつながる塩基置換と 2 塩基欠失が見いだされた。また 3 系統では、想定イントロン末に変異が見出された。cDNA を解析したところ、3 系統のイントロン末変異は、スプライシング異常につながっていることが見いだされた。

これらの塩基変異を分子マーカーに変換し、遺伝解析を行ったところ、表現型と遺伝子型は完全に一致した。

このことから *brh1* は Gα をコードする遺伝子であることが明らかとなった。

また 5 系統の生理学的特徴に顕著な差は見いだされていないこと、変異の見いだされた領域には GTP 結合部位やレセプター結合領域などが存在することなどから、5 系統いずれも Gα タンパク質機能欠損変異体であると考えられる。

G protein α, brassinosteroid, gibberellin

講演番号：2J32p08
講演日時：3 月 18 日 15:55～ J 校舎 32 会場

# 内生植物ホルモン量分析に基づく植物ホルモン受容体制御剤の機能解析研究

# Characterization of receptor inhibitors by quantifying endogenous phytohormones

○都外川 識志[1]、宮崎 翔[1]、尹 禎敏[1]、竹内 純[2]、轟 泰司[3]、林 謙一郎[4]、中嶋 正敏[1]、浅見 忠男[1] ([1]東大院・農生科・応生化、[2]静大・学術院融合グローバル領域、[3]静大・農、[4]岡山理科大・理学部・生物化学科)

○SATOSHI TOTOKAWA[1], SHO MIYAZAKI[1], JUNG-MIN YOON[1], JUN TAKEUCHI[2], YASUSHI TODOROKI[3], KEN-ICHIRO HAYASHI[4], MASATOSHI NAKAJIMA[1], TADAO ASAMI[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo, [2]College of Global-Interdisciplinary, Academic Institute, Shizuoka Univ., [3]Fac. Agric., Shizuoka Univ., [4]Dept. Biotchem, Okayama Univ. of Science)

【目的】 ジベレリンは種子発芽や茎部伸長、花芽形成など植物の様々な成長に関わる植物ホルモンである。その信号伝達機構については、受容体へのジベレリン結合が誘起する受容体と制御因子との相互作用を端緒とすることが既に判明している。演者らはその信号伝達制御において、特に受容体を標的とする化学的制御に興味を持ち、以前の本大会において制御剤候補化合物の選抜状況を報告した[1]。選抜の際は、受容体–制御因子間の相互作用を酵母 two-hybrid 系を用いてモニターしており、*in vitro* 解析結果と合わせて、選抜した候補化合物は受容体を標的とすることを確認している。しかし、植物体への投与に伴い矮化を生じさせるなど、既存受容体制御剤との差異を見つけることは難しい。そこで本大会においては、受容体制御剤の新たな特徴づけを目的として、両化合物を投与した植物体におけるホルモン内生量変化について精査したので報告する。

【方法・結果】 はじめに、ジベレリン以外の植物ホルモン、具体的にはアブシジン酸およびオーキシンを対象として、既にそれらの受容体を標的とすることが明らかな制御剤を用いて、植物体に与える影響を調べた。すなわち、液体培地に発芽 14 日目のシロイヌナズナ幼植物体を加えた後に振盪培養を開始し、馴化後に対象化合物を添加して、LC/MS を用いてその後のホルモン内生量変化を解析した。その結果、各受容体阻害剤の投与により、対応する受容体リガンドであるホルモン量の微増が認められた。これを受けて、ジベレリン受容体制御剤を対象とする同様の実験を計画した。前出のホルモン 2 種と比較して、シロイヌナズナ幼植物体における内生量がより一層少ないジベレリンの量的変化を把握するため、はじめに既報に従って微量分析系を整備した[2]。続いて、2 種のジベレリン受容体制御剤 TY-13 および TY-25 を投与して幼植物体に対する影響を調べたところ、いずれもジベレリン内生量の微増が認められたものの、その応答時期には違いが認められた。現在、本検討により把握したホルモン内生量変化の裏付けをとるべく、当該生合成酵素遺伝子の発現量を解析しており、それらも合わせて報告したい。

[1] 都外川ら、日本農芸化学会 2016 年度大会（札幌）、p.742.
[2] Kojima *et al.*, *Plant Cell Physiol.*, **50**: 1201 (2009).

Gibberellin, Receptor, Inhibitor

講演番号：2J32p09
講演日時：3 月 18 日 16:10～ J 校舎 32 会場

ジベレリン生合成および代謝酵素の構造解析と機能解析
Structural and functional analyses of gibberellin 3-oxidase and 2-oxidase in rice
○竹原 清日[1]、三上 文三[2]、河合 恭甫[1]、松岡 信[1]、上口（田中） 美弥子[1] ([1]名大・生物機能セ、[2]京大院・農)
○Sayaka TAKEHARA[1], Bunzo MIKAMI[2], Kyosuke KAWAI[1], Makoto MATSUOKA[1], Miyako UEGUCHI (TANAKA)[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Kyoto Univ.)

【背景・目的】植物ホルモンのひとつであるジベレリン (GA) は、草丈の伸長促進や発芽促進、花芽形成促進などさまざまな生理作用をもつ。 ジベレリン生合成経路の後半段階においては GA20-oxidase (GA20ox) および GA3-oxidase (GA3ox) が、代謝経路では GA2-oxidase (GA2ox) が働いており、いずれも 2-オキソグルタル酸要求性酸化酵素に属する酵素である。 我々は、これら酵素の構造解析に取り組み、イネの GA 生合成酵素である GA3ox2 および不活化酵素である GA2ox3 の構造を決定した。全体構造を比較したところ GA3ox2 は単量体であるのに対し、GA2ox3 は S−S 結合で結合したダイマー同士が相互作用した 4 量体を形成しており、基質である $GA_4$ が活性中心以外にもダイマー分子の間に結合して 4 量体を形成していることが明らかとなった。 そこで本研究は、GA2ox3 および GA3ox2 の反応性の違いを決定しているアミノ酸を同定し、両酵素がどのように GA を認識しているのかを明らかにすることを目的とした。 さらに 酵素活性により GA の生合成から代謝経路までの一連の機構についても検討した。
【方法・結果】大腸菌で発現した両酵素を蒸気拡散法により基質である GA と共結晶させ、SPring-8 で回折データを得た。 構造解析の結果、両酵素の活性中心に大きな違いが見られ、GA3ox2 の基質である $GA_9$ は GA2ox3 の基質である $GA_4$ とは異なる位置、上下反対向きに結合していた。これにより、GA3ox2 は 3 位に、GA2ox3 は 2 位に水酸基が入りやすいように全く別の残基が GA を固定していることが示唆された。
また、GA2ox3 の多量体構造の形成と酵素活性との関係を調べたところ、*in vitro* と同様に *in planta* でも $GA_4$ 濃度が上昇に伴い多量体構造をとることが明らかとなった。 さらに $GA_4$ を介した 4 量体は単量体に比べ酵素反応速度がはるかに速いことが分かった。 GA3ox2 の酵素活性の結果も合わせて比較すると、$K_m$ 値は GA2ox3（単量体）＞ GA3ox2 ＞GA2ox3（4 量体）の順であった。 以上の結果から、GA2ox3 および GA3ox2 は以前から知られているような遺伝子発現調節だけでなく、タンパク質レベルでも $GA_4$ 濃度に応じて GA 合成および代謝を調節することが示唆された。
本研究の一部は、新学術領域研究により助成された。

gibberellin, plant hormone, dioxygenase

講演番号：2J32p10
講演日時：3 月 18 日 16:25～ J 校舎 32 会場

イネの葯特異的に発現をするジベレリン 3 酸化酵素 1 の機能解析
Gibberellin 3-oxidase 1 is essential for pollen maturation in Rice
○河合 恭甫、竹原 清日、松岡 信、上口（田中） 美弥子（名大・生物機能セ）
○Kyosuke KAWAI, Sayaka TAKEHARA, Makoto MATSUOKA, Miyako UEGUCHI(TANAKA) (Nagoya Univ.)

【背景・目的】植物ホルモンの一種であるジベレリン（Gibberellin, GA）は、植物において発芽・茎や根の伸長・花粉の成熟・花成の誘導など様々な成長過程の制御において重要である。GA3-oxidase（GA3ox）はジベレリンの生合成において鍵となる酵素であり、イネでは OsGA3ox1 と OsGA3ox2 の 2 種類が同定されている。 そこで、この両酵素の活性を調べたところ、どちらの場合も $GA_9$ から本来の生成物である $GA_4$ が合成された他、$GA_7$ の合成も観察された。 しかし、OsGA3ox1 は OsGA3ox2 に比べ $GA_7$ が生成される割合が極めて高いという違いが見られた。 そこで本研究は、特殊な反応性を持つと考えられる OsGA3ox1 の植物における機能を調べることを目的とした。$GA_7$ は *ent*−ジベレラン骨格の 1 位の炭素と 2 位の炭素の間で二重結合を有しており、OsGA2ox によるヒドロキシ基の付加を通した不活性化を受けないため $GA_4$ よりも高い活性を持つと考えられている。
【方法・結果】イネ植物体における *OsGA3ox1* の発現を調べるため、プロモーターGUS による発現解析を行った。 その結果、*OsGA3ox1* は花器官、特に花糸や未成熟の花粉といった雄性器官で発現し、さらに鱗被でも発現していることが示唆された。 さらに、CRISPER/Cas9 system によるノックアウト変異体の作出と表現型解析を行った。 作成した変異体に対し、花粉をヨウ素液で着色してデンプンの蓄積を観察したところ、変異体の花粉ではデンプンの蓄積がほとんど見られず、雄性不稔となった。また、穎の開きが見られない、開花後の花糸が短いなど花器官で特徴的な変異形質が見られた。これらの結果から、$GA_7$ がイネの雄性器官において重要なジベレリンであり、それを生成する OsGA3ox1 は雄性の生殖器官の発達や機能に重要であることが示唆された。さらに、イネ科における *OsGA3ox1* の進化についても合わせて報告する。
この研究は一部新学術領域研究によって助成された。

gibberellin, plant hormone, flower development

講演番号：2J32p11
講演日時：3 月 18 日 16:50～ J 校舎 32 会場

*Oryza* 属におけるジベレリン生合成 *ent*-カウレン合成酵素遺伝子
*ent*-Kaurene synthase genes responsible for gibberellin biosynthesis in *Oryza* species

○豊増 知伸[1]、伊藤 瑛[1]、宮本 皓司[2]、Matthew Shenton[3]、今井 亮三[4]、三橋 渉[1]、倉田 のり[3]、山根 久和[2]、岡田 憲典[5]（[1]山形大農、[2]帝京大バイオ、[3]遺伝研、[4]農研機構、[5]東大生工セ）
○Tomonobu Toyomasu[1], Akira Itoh[1], Koji Miyamoto[2], Shenton Matthew[3], Ryozo Imai[4], Wataru Mitsuhashi[1], Nori Kurata[3], Hisakazu Yamane[2], Kazunori Okada[5] ([1]Yamagata Univ., [2]Teikyo Univ., [3]NIG, [4]NARO, [5]Univ. of Tokyo)

栽培イネ（*Oryza sativa*：Os）は、植物ホルモンのジベレリンだけでなく、多様なジテルペノイドを生合成するが、それにはフィトアレキシンのモミラクトン、ファイトカサン、オリザレキシンも含まれる。それらの基本炭素骨格は、ジテルペノイド共有の直鎖状プレニル基質ゲラニルゲラニル 2 リン酸（GGDP）より *ent*-コパリル 2 リン酸（*ent*-CDP）あるいはそのジアステレオマー*syn*-CDP を経て生成するが、この 2 段階の環化反応は、ジベレリン生合成中間体 *ent*-カウレン生成に関与する *ent*-CDP 合成酵素（CPS）と *ent*-カウレン合成酵素（KS）の多様なホモログ（パラログ）群によって触媒される：OsCPS1, 2, 4 と OsKS1、KSL2, KSL4, KSL5, KSL6, KSL7, KSL8, KSL10。双子葉植物などでは CPS と KS のパラログは限られており、シロイヌナズナゲノムではジベレリン生合成関連の 1 種ずつ(AtCPS と AtKS）しかみられない。Os でもジベレリン生合成に関与するのは OsCPS1 と OsKS1 だけと考えられている。そこで演者らは Os ゲノムにおける多様な *CPS* と *KSL* パラログの獲得の進化的知見を得るために、野生イネを材料とした比較ゲノム学をベースに研究を進めているところである。その中で、AA ゲノム種に含まれる Os とは最も遠縁で、ゲノム情報が利用可能な FF ゲノム種の野生イネである *Oryza brachyantha*（Ob）のゲノムにおいて、ジベレリン生合成 *OsCPS1*（2 番染色体）と *OsKS1*（4 番染色体）とシンテニーのあるホモログがみられた。さらに、Os ゲノムにおいて *OsKS1* の両端には、*OsKSL2* と *OsKSL3* がタンデム座乗しているが、Ob ゲノムにおいても *ObKSL2*、*ObKS1*、*ObKSL3* が同様にタンデムに並んでいた。このことと系統樹解析から、Os と Ob の共通の先祖において、既にジベレリン生合成 KS 遺伝子の重複は起こっていたと考えられた（Miyamoto et al, 2016, *Plant J.*）。ところが、*ObKS1* の推定 mRNA 配列を基に RT-PCR を行ったところ、正常にスプライシングされた転写物由来の cDNA を得ることが困難であった。そこで本研究では、Ob ではジベレリン生合成に関与する *KS* は *ObKS1* とは別の遺伝子であるという可能性を検討することにした。*OsKSL2* は、ストレスに応答してイネの根で特異的に発現することが最近明らかになり、未知なるジテルペン系ファイトアレキシンの生合成に関与すると考えられている（Tezuka et al., 2015, *BBRC*）。*OsKSL3* は、少なくとも Os 日本晴からは第 10 エキソンのスプライシング異常によるフレームシフト変異した転写物由来 cDNA しか得られておらず、完全 KSL をコードする cDNA は得られていない（Kanno et al, 2006, *BBB*）。本発表では、Ob における *KSL2* と *KSL3* の特徴付けについて報告する。

gibberellin biosynthesis, ent-kaurene synthase gene, rice

発表責任者：豊増知伸（toyomasu@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp）

講演番号：2J32p12
講演日時：3 月 18 日 17:05～ J 校舎 32 会場

ジベレリン活性制御剤の探索および機能解析
Chemical regulation of gibberellin biosynthesis with inhibitors targeted to alpha-ketoglutarate-dependent dioxigenases
○下尾 純平、宮崎 翔、大谷 征史、都外川 識志、中村 英光、中嶋 正敏、浅見 忠男（東大院・農生科・応生化）
○Junpei Shimoo, Sho Miyazaki, Masato Otani, Satoshi Totokawa, Hidemitsu Nakamura, Masatoshi Nakajima, Tadao Asami (Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo)

【目的】　植物ホルモンのジベレリンは、種子発芽、茎部伸長、花器官や種子の発達など植物の成長に深く関与しており、果実の落下防止や着花促進を目的とする生長調節剤として、農業上広く利用されている。そのジベレリン生合成の終盤過程は、2-オキソグルタル酸要求性ジオキシゲナーゼ（2ODD）に区分される酵素群が関わることで厳密に活性発現が制御されている。すなわち、自身が生理活性を示すいわゆる活性型ジベレリンへの触媒反応を GA 3-oxidase 酵素が担い、GA 2-oxidase 酵素がその活性型を代謝不活性化する触媒反応を担っている。これら 2ODD に属する 2 つの酵素、GA 3-oxidase と GA 2-oxidase では基質となり得るジベレリンに一部重複が認められ、活性制御を考える上でも非常に重要な制御点となっている。演者らは、これら酵素群を対象とする化学的な制御に興味を持ち、以前の大会において GA 2-oxidase 制御剤の候補選抜について報告した[1]。今大会においては、選抜化合物およびその類縁体が、GA 3-oxidase／GA 2-oxidase 間で制御作用選択性を示す可能性について追及することを目的として検討を加えた。
【方法・結果】　常法に従い大腸菌発現系を用いて、シロイヌナズナに由来する GA 3-oxidase、および、GA 2-oxidase の各リコンビナントタンパク質を調製し、放射性標識されたジベレリンを基質に用いて *in vitro* における酵素反応阻害状況を比較した。解析対象とした化合物をこの系に添加し、イメージングアナライザーを用いた画像解析によりその影響を調べた結果、大半は GA 2-oxidase と GA 3-oxidase、いずれの触媒反応も同程度に制御する化合物であったが、中にはどちらか片方をより選択的に制御する傾向を持つ化合物も確認された。これら作用の選択性について、植物種を変えても成立するものであるか確認すべく、イネ由来の GA 3-oxidase、および、GA 2-oxidase の各リコンビナントタンパク質を調製して同様の検討を行った結果、やはりシロイヌナズナ由来の分子種に対して認められた傾向に概ね従う傾向が確認された。これら制御剤投与時における関連遺伝子の発現状況、および、植物体への投与結果についても併せて報告したい。
[1] 下尾ら、日本農芸化学会 2016 年度大会（札幌）

gibberellin, inhibitor, alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase

講演番号：2J32p13
講演日時：3 月 18 日 17:20～ J 校舎 32 会場

光学活性ジャスモン酸のイネにおける生理活性
Biological activity of optically-active jasmonic acid in rice
○宮本 皓司[1]、内田 健一[1]、湯本 絵美[1]、酒澤 智子[1]、柴田 恭美[1]、横田 孝雄[1]、飯野 盛利[2]、山根 久和[1] ([1]帝京大バイオ、[2]大阪市大院・理)
○ Koji MIYAMOTO[1], Kenichi UCHIDA[1], Emi YUMOTO[1], Tomoko SAKAZAWA[1], Kyomi SHIBATA[1], Takao YOKOTA[1], Moritoshi IINO[2], Hisakazu YAMANE[1] ([1]Teikyo Univ., [2]Osaka City Univ.)

ジャスモン酸（JA）は、ストレスに対する防御応答の誘導や老化促進、伸長の抑制などの様々な生理活性を有する植物ホルモンである。天然型の JA は(-)-JA であるが、非天然型の(+)-JA もイネに対して伸長抑制活性を示すことが報告されている（Yamane et al., 1981）。また、JA の活性本体はイソロイシンが結合した jasmonoyl isoleucine (JA-Ile)であると考えられるが、シロイヌナズナにおいて非天然型の(+)-JA-Ile も天然型の(-)-JA-Ile と同等に活性を示すことが明らかになっている（Fonseca et al., 2009）。以上のことから、JA の受容やシグナル伝達機構を理解する上で JA や JA-Ile の各異性体の活性を正しく評価することが重要であると言える。そこで、本発表では光学活性な JA を用いてイネにおける抗菌性二次代謝物質ファイトアレキシンの生産誘導活性や伸長抑制活性などを検討するとともに、それぞれの JA がイネ生体内において JA-Ile に変化されるかどうかについて解析したので報告する。

まず、JA をオキサゾリジノン誘導体としシリカゲルクロマトグラフィーにより分離した後に、加水分解することで光学活性 JA を得た。得られた光学活性 JA について、キラルカラムを用いた LC-MS/MS 分析を行ったところ、ほぼ完全に光学分割されていることが確認された。次に、これらの光学活性 JA のイネ幼苗における第二葉鞘の伸長抑制活性を検討した結果、非天然型の(+)-JA は(-)-JA の約 1/5 の活性を有することが明らかになった。また、イネ葉身にこれらの光学活性 JA を処理し、72 時間後のファイトアレキシンの蓄積量を定量した。その結果、モミラクトン類、ファイトカサン類、サクラネチンのいずれの成分の蓄積についても、非天然型の(+)-JA は(-)-JA の 1/10 から 1/5 程度の誘導活性を示した。さらに、(+)-JA および(-)-JA をイネの JA 生合成変異株である *cpm2* に対してフィードし、処理後 2 時間において JA-Ile へと変換されているかを解析した。その結果、天然型の 1/5 程度であるものの、(+)-JA から(+)-JA-Ile への変換が確認された。

以上のことから、イネ生体内において非天然型の(+)-JA も(+)-JA-Ile へと変換され、防御応答の誘導や伸長の抑制といった生理活性を示すことが明らかになった。また、 (+)-JA が(-)-JA よりも活性が弱い原因の１つとして、JA から JA-Ile への変換効率に差があることが考えられた。

[1] Ymane H et al., Agric Biol Chem 45:1709-1711 (1981)
[2] Fonseca S et al., Nat Chem Biol 5:344-350 (2009)

jasmonic acid, rice

発表責任者：宮本　皓司（miyamoto@nasu.bio.teikyo-u.ac.jp）

講演番号：2J32p14
講演日時：3 月 18 日 17:35～ J 校舎 32 会場

イヌカタヒバにおけるジャスモン酸類の同定および機能解析
Functional analysis of jasmonates in *Selaginella moellendorffii*
プラティウィ プトリ[1]、○高橋 公咲[1]、高橋 知寛[1]、謝 肖男[2]、米山 弘一[2]、松浦 英幸[1]([1]北大院農、[2]宇都宮大バイオ)
Putri Pratiwi[1], ○Kosaku Takahashi[1], Tomohiro Takahashi[1], Xiaonan Xie[2], Koichi Yoneyama[2], Hideyuki Matsuura[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Utsunomiya Univ.)

［背景・目的］
ジャスモン酸（JA）は、植物の傷害応答、分化および生長を司る重要な植物ホルモンである。シロイヌナズナをはじめとした被子植物では、JA のイソロイシン縮合体（JA-Ile）の F-box タンパク質 COI1 への結合が引き金となり、JA 応答性遺伝子の発現が誘導される。その一方で、苔類のモデル植物であるゼニゴケ（*Marchatia polymorpha*）および蘚類のモデル植物であるヒメツリガネゴケ（*Physcomitrella patens*）は JA を生産せず、JA の生合成中間体である 12-オキソファイトジエン酸（OPDA）がシグナル分子として機能していると考えられている。本研究では、植物進化の過程においてコケ植物と被子植物の中間に位置するシダ植物のモデル植物のイヌカタヒバ（*Selaginella moellendorffii*）における JA の機能を明らかにすることを目的として、JA 類の内生量、JA 生合成酵素活性およびその遺伝子発現の解析を行った。

［方法・結果］
イヌカタヒバをエタノールで抽出し UPLC-MS/MS を用いて JA 類の分析を行ったところ、OPDA、JA および JA-Ile のピークが確認された。イヌカタヒバの JA 類の生合成に関与すると予想されたアレンオキシドシンターゼ（SmAOC1）、OPDA 還元酵素（SmOPR5）および JA-Ile 合成酵素(SmJAR1)の組換えタンパク質を作製し、それらの酵素活性を調べたところ、いずれもアミノ酸配列から推定される酵素活性を示した。これらの結果から、イヌカタヒバは OPDA、JA および JA-Ile を生産することが明らかとなった。また、OPDA、JA および JA-Ile の内生量は傷害ストレスにより増加することが判明した。さらに傷害ストレスおよび JA 処理により *SmAOC1* および *SmOPR5* の遺伝子発現が上昇することも明らかとなった。従って、イヌカタヒバにおいても JA が傷害ストレスにより誘導されるシグナル分子として機能していることが示された。コケ植物が JA を生産しないことを考慮すると、陸上植物がシダ植物（維管束植物）に進化したことにより JA 生合成経路および JA シグナル伝達経路を獲得した可能性が示唆された。

Jasmonates, *Selaginella moellendorffii*, Stress

発表責任者：高橋公咲（kosaku@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：2J32p15
講演日時：3 月 18 日 17:50～ J 校舎 32 会場

# Cytokinin dehydrogenase を反応機構的に阻害する蛍光標識分子の合成

# Synthesis of mechanism-based inhibitors with the fluorescence for Cytokinin dehydrogenase

○黒沼 亜希子、飯野 誠之、杉山 民二 (明治大院農)
○Akiko KURONUMA, Masayuki IINO, Tamizi SUGIYAMA (Meiji Univ.)

【目的】

Cytokinin Dehydrogenase(CKX)は、植物体内のサイトカイニンを不可逆的に分解することで、その生体内レベルを調整している。CKX は、FAD を補酵素とするデヒドロゲナーゼ様の酵素である。J.C.Suttle と R.Mornet(2005)は、$N^6$-isopentenyladenine(iP)の $N^6$ 側鎖に but-2,3-dienyl 基を導入した化合物の CKX 阻害作用を検討した結果、本化合物は CKX の FAD を不可逆的に攻撃する反応機構的阻害分子(自殺基質)であることを報告した。

私たちは、蛍光基質を用いて、CKX の高感度な活性測定法を検討している。$N^6$-isopentenyl-$N^2$,N3-ethenoadenine アナログが蛍光基質として利用できることが判った。そこで ethenoadeninde の $N^6$ 位に but-2,3-dienyl 基を導入した蛍光標識分子 $N^6$-(but-2,3-dienyl)-9-alkyl-$N^2$,N3-ethenoadenine (Fig.1)を合成し、CKX に対する阻害作用を調べることを本研究の目的とした。

【方法と結果】

2-amino-6-chloro-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)purine を原料とし、triethylamine 存在下で but-2,3-dienylamine hydrochloride と 4 時間還流した。生成物 2-amino-6-(but-2,3-dienyl)-9-(tetrahydro-2H-pyran-2yl)adenine (comp.1)は、NMR によりアレン側鎖の導入を確認した。融点は、158-161℃であった。

次に、comp.1 を 40% Chloroacetaldehyde 水溶液と酢酸緩衝液 (pH 4.8)を用いて、42℃、3.5 時間撹拌させ、エテノ環の形成を試みた。この反応においては、TLC 上で angular 型と linear 型の異性体が生成した。それらを flash column chromatography で分離、精製をした。NOE 測定により、両異性体を同定した。これら化合物の蛍光特性、さらに CKX に対する阻害作用について検討している。

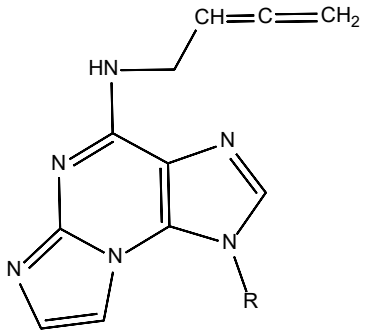



Fig.1　$N^6$-(but-2,3-dienyl)-9-alkyl-$N^2$,N3-ethenoadenine

cytokinin, cytokinin dehydrogenase

講演番号：2J32p16
講演日時：3 月 18 日 18:05～ J 校舎 32 会場

植物病害抵抗性制御剤の開発と構造活性相関研究
Development and Structure-activity relationship analysis of plant disease resistance regulator
○青木 智史、姜 凱、高橋 郁夫、栗本 哲哉、中村 英光、浅見 忠男（東大院・農生科・応生化）
○Satoshi AOKI, Kai JIANG, Ikuo TAKAHASHI, Tetsuya KURIMOTO, Hidemitsu NAKAMURA, Tadao ASAMI (Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo)

【背景】サリチル酸（SA）は植物の免疫に深く関与しており、病原菌が感染することで植物体内に蓄積され、二次感染を防御する全身獲得抵抗性(Systemic acquired resistance/SAR)とよばれる免疫機構を誘導することが知られている。しかしその詳細なメカニズムについては、不明な点が多い。これまでに、SAR 機構の解明を目的として、BIT や BTH[1]などの SAR シグナル誘導剤が活用されてきたが、SAR をターゲットとする阻害剤については殆ど報告されていなかった。そこで当研究室では、SAR 誘導阻害剤の探索研究を行うことで、これまでに SAR のマーカー遺伝子である SA 誘導性 *PR1*(pathogen-related 1)遺伝子の発現を阻害する PAMD を報告していた[2]。PAMD は SAR 誘導阻害剤として高い活性を有する一方で、同時に強い植物の生育阻害効果を示すことが特徴であった。そこで本研究では、今後の応用研究へと繋げることを目的として、新たな候補阻害物質の探索と、選抜した化合物の構造活性相関研究を行った。
【方法】当研究室の保有する 10,000 種の化合物ライブラリーを用いて、*PR1:GUS* シロイヌナズナを各種化合物含有(25 μM)培地上に播種した。10 日後、SAR 誘導物質である SA（2 mM)を噴霧処理した後、3 日後に GUS 染色試験を行い、GUS 活性の阻害効果を示す化合物を選抜した。続いて、*PR* 遺伝子の発現量をリアルタイム PCR で比較し、胚軸、根長を測定することで SA 誘導遺伝子及び生育の阻害活性を詳細に確認し、新たな阻害候補物質である NAS1 を見出した。その後 NAS1 の誘導体を、ベンゾイミダゾールアセトニトリルとカルボン酸誘導体とのカップリングによって合成した。種々の NAS1 誘導体は、同様に *PR* 遺伝子の発現量によってその活性を比較した。
【結果と考察】GUS 染色試験を用いた化合物スクリーニングから、10,000 化合物より生育阻害活性を解消し、同時に SA 誘導遺伝子の阻害活性を示す NAS1 を見出した。更にその構造展開により、NAS1 の有するイミダゾール骨格が *PR1* 遺伝子の発現を阻害する活性に重要であることが示唆された。また、カルボニル基に隣接する置換基を変換してもその活性には大きく影響を及ぼさないことが分かった。このように、NAS1 は従来の PAMD より優れた SAR 誘導阻害剤であることが示唆される一方で、水および有機溶媒への溶解性が著しく低いなどの課題も見受けられた。現在、NAS1 の溶解性向上を目的とした構造展開に加え、作用点解明に向けた更なる応用研究を行っている。
【参考文献】1）Nakashita et al., *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2002, *61*, 197
2）Seo et al., *Bioorg.Med. Chem. Lett.* 2012, *22*, 1761

Salicylic acid, systemic acquired resistance, *PR* genes

発表責任者：青木 智史（payao.ut.agchem2034@gmail.com）

講演番号：2J33a01
講演日時：3 月 18 日 09:20～ J 校舎 33 会場

# アルキルグリコシドを糖受容体とするα-アミラーゼによる酵素的配糖化反応の最適化

# Optimization of alpha-amylase-catalyzed glycosyl transferring reaction to various alkyl glycosides

○伊藤 博、小林 厚志（日大工）
○Hiroshi ITO, Atsushi KOBAYASHI (Nihon Univ.)

**【研究背景】**アルキルグリコシド(AG)は界面活性を有する配糖体であり、アグリコン、グリコン部位の組み合わせにより、各種溶媒に対する溶解性の制御が可能である。我々はこれまでに、この AG を糖受容体に、各種オリゴ糖を糖供与体としたα-アミラーゼ触媒による AG への配糖体（アルキルポリグリコシド：APGs）の合成反応について報告してきた。しかしその導入鎖長を制御することは困難であり、その鎖長を制御するためには、酵素タンパク質の改変または基質と酵素の混合比等の反応初期条件の精密なコントロールが重要となる。そこで今回、効率的な検証手法として、既存の酵素反応シミュレーションを活用することにより APGs の合成に有利な条件を選択した上で、基質、酵素混合比を設定し、より効率的な APGs のグリコン部位の鎖長制御を目指した結果について報告する。

**【計算と実測の併用による反応設計】**図 1 に本研究において用いた効率的 APGs 合成のための条件設計の概略を示す。最初に、酵素反応中におけるオリゴ糖の濃度変化の推移を既存の解析モデルを活用する事により、APGs 合成に有利な条件を予測し、糖供与体－α-アミラーゼ混合比 **A** を設定する（①）。その後、糖受容体として用いる AG の溶解性、臨界ミセル濃度等の実験環境を考慮した上で糖受容体

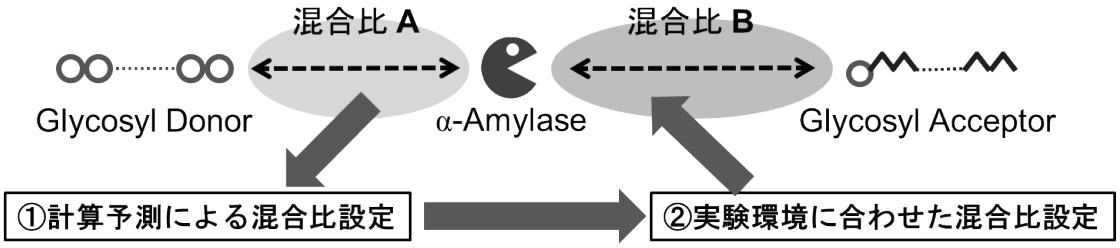



図 1　配糖化条件設計のための計算と実測の併用

－α-アミラーゼ混合比 **B** を設定する（②）。この①、②により設定した混合比 **A**、**B** を基にした実測の評価を、TLC、HPLC、MALDI-TOF MS による反応追跡により行った。

糖供与体にマルトテトラオースを主成分とするフジオリゴ#470（G4, 日本食品化工株式会社）、糖受容体に有機化学合成により得た *n*-Octyl 1-thio-β-D-glucoside (*S*C8G1)、α-アミラーゼ酵素製剤として *Bacillus subtilis* 由来のものを用いた系に対し、本手法により設定した混合モル比率（G4：*S*C8G1：酵素 ≈ 10,000：50：1）で検討したところ、TLC および MALDI-TOF MS により *S*C8G3, *S*C8G4, *S*C8G5, *S*C8G6 の存在を確認した。今回、様々な AG に本手法を適用した結果についても議論する予定である。

enzyme mechanism of alpha-amylase, computer simulation, alkyl glycosides

講演番号：2J33a02
講演日時：3 月 18 日 09:35～ J 校舎 33 会場

新規特性を有するシアノバクテリア由来枝切り酵素の構造機能解析
Structure-function relationship of cyanobacterial branching enzymes having novel property
木村 友亮[1]、○鈴木 龍一郎[1]、佐々木 柾秀[1]、COLLEONI Christophe[2]、BALL Steven[2]、藤田 直子[1]、鈴木 英治[1]([1]秋田県大生物資源、[2]リール科技大)
Yusuke KIMURA[1], ○Ryuichiro SUZUKI[1], Masahide SASAKI[1], Christophe COLLEONI[2], Steven BALL[2], Naoko FUJITA[1], Eiji SUZUKI[1] ([1]Akita Pref. Univ., [2]Lille Univ.)

【目的】シアノバクテリアは一般に貯蔵多糖としてグリコーゲンを蓄積するが、*Cyanobacterium* sp. CLg1 株など一部の種は不溶性・高分子多糖であるα-グルカン（シアノバクテリア澱粉）を蓄積することが知られている。枝切り酵素（EC 3.2.1.68）は、α-グルカンの α-1,6 結合の加水分解反応を触媒する。CLg1 株は、糖加水分解酵素ファミリー13 サブファミリー 11（GH13_11）に属する 2 種類の枝切り酵素 GlgX1 および GlgX2 を有しており、両者の一次構造相同性は 45.8% である。紫外線誘発変異株の解析から、GlgX2 のみが不溶性多糖の特異的構造形成に直接的に関与することが報告されている（Cenci *et al.*, 2013)。しかしながら、リコンビナント酵素の機能解析は未報告である。そこで本研究では、これら酵素の構造機能相関の解明を目的として、詳細な特性解析および結晶構造解析を行った。
【方法】CLg1 株由来 *glgX1* および *glgX2* 遺伝子を PCR によりクローン化し、大腸菌内で大量発現させ、精製リコンビナント酵素標品を得た。基質として市販のアミロペクチン、グリコーゲン、プルラン、およびホスホリラーゼ限界デキストリンを用いて反応させ、ソモギーネルソン法および鎖長分布解析法によって両酵素の特性を解析し比較した。さらに GlgX2 については、シッティングドロップ蒸気拡散法により結晶化し、高エネルギー加速器研究機構において X 線結晶構造解析を行った。
【結果】各 GlgX 標品について活性測定を行ったところ、GlgX1 はプルランに対して最も高い比活性を示した。一方、GlgX2 の活性は $Mg^{2+}$ イオンに強く依存し、アミロペクチンに対してのみ極めて高い比活性を示した。以上の結果から、GlgX1 は短鎖の基質を好むが、GlgX2 は長鎖の基質を好むことが明らかとなった。これは、GlgX1 および GlgX2 が、それぞれα-グルカン分子の分解と合成に関わることを示唆している。
次に、GlgX2 のリガンドフリー状態の結晶構造を 2.3 Å 分解能で決定した。これまでに、4 種の GH13_11 枝切り酵素の結晶構造(大腸菌由来 EcGlgX、*Pseudomonas* 由来 PaISA、*Sulfolobus* 由来 TreX、*Chlamydomonas* 由来 CrISA1）が報告されている。短鎖を切断する酵素（EcGlgX、TreX）では、触媒クレフト付近のループ構造が壁を形成するが、長鎖を切断する酵素（PaISA、CrISA1）の対応するループ構造は、触媒クレフトから遠くに位置する。それゆえ、このループ構造が酵素特性を制御していると推測された。しかし、長鎖を切断する特性を示す GlgX2 では、触媒クレフトの近くにループ構造の壁が見出され、三次構造と触媒特性の相関は必ずしも当てはまらないことが示唆された。

Branching enzyme, Starch, Cyanobacteria

発表責任者：鈴木龍一郎（ryuichi@akita-pu.ac.jp）

講演番号：2J33a03
講演日時：3 月 18 日 09:50～ J 校舎 33 会場

マツタケ（*Tricholoma matsutake*）由来菌体外グルコアミラーゼの精製と性質
Purification and characterization of extracellular glucoamylase from *Tricholoma matsutake*
○原 健人、大沼 広宜、亀井 健吾、福田 泰久、白坂 憲章（近大農）
○Kento HARA, Hiroki ONUMA, Kengo KAMEI, Yasuhisa FUKUTA, Norifumi SHIRASAKA (Kindai Univ.)

[背景] 外生菌根菌である *Tricholoma matsutake* の純粋培養の問題点の一つとして，デンプンやセルロースといった高分子多糖類を分解し栄養を摂取するために必要な酵素の生産性が微弱であることが挙げられる．現在までに，*T. matsutake* の生産する糖質分解酵素系においては，α-アミラーゼや極めて強い β-グルコシダーゼ活性を示すことを明らかにされたが，グルコアミラーゼや α-グルコシダーゼの活性については殆ど検出されず，*T. matsutake* 単体でのデンプン利用能は低いと考えられてきた．一方で，演者らは単一の炭素源として、低分子アミロース（分子量; 約 2,900）等のデンプン基質を唯一の炭素源として培養すると，グルコースや他の単糖・二糖類を用いた培養と比較してグルコアミラーゼ活性の増加(7.9～29.4 倍)し，遺伝子発現量が増加することを見出している(24.4～80.3 倍)．本研究では、グルコアミラーゼを単離しその機能について解明することを目的とした．演者らは，*T. matsutake* NBRC30605 株より誘導生産される菌体外グルコアミラーゼの精製を行い，酵素化学的諸性質について報告する。

[方法と結果] 本研究室保存の *T.matsutake* NBRC30605 株を 2.0 % 可溶性デンプン，0.5 % Yeast Extract の液体培地（pH 5.1）に接種後 60 日間静置培養した培養ろ液よりグルコアミラーゼを，硫安分画，Toyopearl NH2-750F，Toyopearl Butyl-650M，Toyopearl HW-55F の各種カラムクロマトグラフィーにより単一に精製した．本酵素の分子量では SDS-PAGE では 61,500 であり，HPLC を用いたゲルろ過により 63,950 と算出され，単量体であると推察された．また，MALDI-TOF/TOF MS (Autoflex speed TOF/TOF KN2 system; Bruker) を用いて内部アミノ酸配列を決定した結果，NCBI BLAST では *T. matsutake* NBRC30773 株由来グルコアミラーゼ（*Tm*Glu1），また，JGI *T. matsutake* 945 v3.0 BLAST system では Glycoside hydrolase, family 15 Protein が得られたペプチド断片と一致した．推定コード配列は 1707bp，アミノ酸残基数は 576 であった．本酵素を用いて基質特異性を検討したところ，可溶性デンプン以外にプルランやアミロペクチンなどにも加水分解活性を示した．また，その他の酵素化学的諸性質についても報告する．

[謝辞] 本研究は文部科学省 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 S1512004 の助成を受けたものである．

*Tricholoma matsutake*, Glucoamylase, Amylose

講演番号：2J33a04
講演日時：3 月 18 日 10:05～ J 校舎 33 会場

# マツタケ（*Tricholoma matsutake*）由来菌体外グルコアミラーゼの *Pichia pastoris* による分泌発現

Secretry expression of glucoamylase from *Tricholoma matsutake* in *Pichia pastoris*

○大沼 広宜、原 健人、内山 寛人、亀井 健吾、福田 泰久、白坂 憲章（近大農）
○Hiroki ONUMA, Kento HARA, Hiroto UCHIYAMA, Kengo KAMEI, Yasuhisa FUKUTA, Norifumi SHIRASAKA (Kindai Univ.)

[背景] 演者らは，*Tricholoma matsutake* の純粋培養による人工栽培において利用可能な糖質基質およびそれらを分解する酵素系の探索を行っている．マツタケの生産する糖質分解酵素については，α-アミラーゼ，β-グルコシダーゼの単離精製，酵素化学的諸性質が明らかにされている．しかし，それ以外のマツタケの糖質分解酵素系については明らかにされておらず，グルコアミラーゼやα-グルコシダーゼの活性については殆ど生産されないとされてきた．前演者らにより *T. matsutake* NBRC 30605 株が生産するグルコアミラーゼ（*Tm*Glu1）を単一に精製し，内部アミノ酸配列を決定し，その酵素化学的諸性質について明らかにした．本発表では、本酵素の詳細な機能について検討することを目的とし，*Tm*Glu1 の *Pichia pastoris* による分泌発現について報告する．

[方法と結果] 本研究室保存の *T.matsutake* NBRC30605 株を 2.0 % 可溶性デンプン，0.5 % Yeast Extract の液体培地（pH 5.1）に接種後 30 日間静置培養により生育させた後，培養菌糸体より gDNA および mRNA を抽出し，gDNA と RT-PCR により合成した cDNA を鋳型として，クローニングを行った．クローニングで得られた *Tm*Glu1 遺伝子の Gene sequence は 2186bp であり，*T. matsutake* NBRC30605 株の WGS の Contig 配列上に一致する配列が見られた．また，NCBI BLAST および JGI *Tricholoma matsutake* 945 v3.0 BLAST system に検索を供したところ，CDS は 1707bp で 7 つのイントロン部位を有する Glycoside hydrolase, family 15 Protein のグルコアミラーゼであったが，予測されるシグナルペプチドが一部異なっていた．*Pichia pastoris* X-33 株に分泌発現させた *Tm*Glu1 は *T. matsutake* NBRC30605 株由来の精製酵素と同様なグルコアミラーゼ活性を示し，分泌生産量としては，40.8U/L; 3.63mg/L オーダーであった．以上の結果より，*T. matsutake* はデンプンまたはアミロースの存在下でグルコアミラーゼが誘導生産され，単独でもデンプンをグルコースまで分解・利用が可能であることが示唆された．

[謝辞] 本研究は文部科学省 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 S1512004 の助成を受けたものである．

*Tricholoma matsutake*, Glucoamylase, *Pichia pastoris*

講演番号：2J33a05
講演日時：3 月 18 日 10:20～ J 校舎 33 会場

# 非凍結結晶を用いたβ-アミラーゼ／基質複合体の pH による構造変化の解析

# Crystallographic analysis of structural change of ß-amylase/substrate complex caused by pH

○三上 文三[1]、河村 和広[1]、安達 基泰[2]、姜 有那[1]、水谷 公彦[1]、高橋 延行[1]（[1]京大農、[2]日本原子力機構）
○Bunzou Mikami[1], Kazuhiro Kawamura[1], Motoyasu Adachi[2], Youna Kang[1], Kimihiko Mizutani[1], Nobuyuki Takahashi[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Japan Atomic Energy Agency)

【目的】ダイズ β－アミラーゼの活性中心付近には触媒残基である二つの Glu 残基(Glu186 と Glu380)の他に、最大 11Å 移動する 9 残基のフレキシブルループと主鎖の構造がアポ型からプロダクト型に切り換わる 5 残基のインナーループの二つの可動ループ、およびアポ型と基質複合体で側鎖の構造が変化する Lys295 が存在する。本酵素の生成物であるマルトースは本酵素の-2,-1 と+1,+2 のサブサイトに連続して 2 分子が結合するが、-1 サイトのグルコースの環はαアノマーのボート型に歪むことが知られている。今回は、実際の基質とβ-アミラーゼとの相互作用を結晶内で解析するために、キャピラリーを用いた非凍結状態でのＸ線結晶構造解析を行い、酸触媒残基の変異体である E186A についてマルトペンタオース（G5）との結合のｐＨ依存性について検討した。
【方法】ダイズβ - アミラーゼの E186A 変異体の三方晶の結晶はｐH5.4、42%飽和硫安溶液中でハンギングドロップ蒸気拡散法によって作製した。得られた結晶はｐＨ 3.3～8.8 に調整した 20mM G5 を含む母液に５分間ソーキングした後に、ガラスキャピラリー中に封じ、SPring-8 の BL26B1 と BL38B1 で室温で非凍結状態でＸ線回折データの収集を行った。一部のデータは pH を固定し、G5 の濃度を 0～40 ㎜ で変化させて回折データを収集した。構造の精密化の計算には主に SHELXL を、モデリングには COOT を使用した。
【結果】非凍結状態での回析データの収集は分解能 1.6～2.0 Åで行った。本酵素の至適ｐＨである 5.4 以上では G5 は本酵素の -2 ～ +3 のサブサイトに連続して結合し、フレキシブルループはクローズド型であり、インナーループは主にアポ型であった。ｐＨを変化させると、ｐＨ４以下ではフレキシブルループはオープン型となり、サブサイト-1 と+1 の電子密度は不鮮明になる。また、すべての pH において、インナーループと Lys295 の側鎖のディスオーダーが見られた。酸性 pH での基質の結合とフレキシブルループの構造変化には、変異をいれていない塩基触媒残基である Glu380 の解離が強く影響していると推定された。現在、インナーループと Lys295 の構造変化の pH 依存性の詳細について検討している。

β-amylase, crystal analysis, enzyme mechanism

発表責任者：三上文三（mikami@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2J33a06
講演日時：3 月 18 日 10:45～ J 校舎 33 会場

Characterization of thermostable α-glucosidase from *Geobacillus caldoxylosilyticus* NBRC 107762, which displays remarkable transglucosylation

○Min MA, Masayuki OKUYAMA, Takayoshi TAGAMI, Atsuo KIMURA (Hokkaido Univ.)

[Objective] Enzymes from thermophilic microorganisms have received much attention because of their good stability as well as high efficiency in the industrial processes which are mostly performed at high temperature. Aim of this study is the characterization of catalytic properties of an α-glucosidase belonging to glycoside hydrolase family 31 (GcAG31) from thermophilic bacteria, *Geobacillus caldoxylosilyticus* NBRC 107762.

[Methods and Results] A gene encoding GcAG31 was cloned into pCold Ⅰ DNA plasmid. The recombinant protein with hexa histidine-tag at N-terminus was produced at 15°C in *Escherichia coli*. Cell-free extract obtained was treated at 60°C for 30 min and resultant debris was removed by centrifugation. Supernatant was subjected to a Ni-affinity column chromatography. Basic enzyme characteristics were analyzed. The optimum pH for hydrolysis of maltose was 5.9. Recombinant GcAG31 was stable at a pH range of 6.1 to 9.1 at 4°C for 24 h and less than 55°C for 2 h at pH 6.2. The kinetic analysis for hydrolysis of substrates demonstrated that maltotetraose was the most favorable among the series of maltooligosaccharides. GcAG31 also preferred an α-(1→4) glucosidic linkage and hardly ever hydrolyzed an α-(1→6) glucosidic linkage. The reaction products from 10, 50, 100 mM maltose were monitored by HPAEC-PAD analysis and the initial velocities of their formation were estimated. In all substrate concentrations tested, GcAG31 synthesized maltotriose and 3-*O*-α-glucosyl-maltose, which were generated by transglucosylation, indicating that GcAG31 had ability to transfer an α-glucosidic moiety with α-(1→4) or α-(1→3) regioselectivity. The initial velocities of the reaction products displayed that the ratio of α-(1→3) and α-(1→4)-transfers were almost identical and 35% of all reactions was transglucosylation when 10 mM maltose was used as substrate. With the increase of substrate concentration, the transglucosylation ratio (transglucosylation per all reactions) increased 71% (50 mM maltose) and 82% (100 mM maltose). The findings allow us to find the remarkable transglucosylation.

heat-resistant glucosidase, glycoside hydrolase family 31, transglucosylation

発表責任者：Masayuki Okuyama（okuyama@abs.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：2J33a07
講演日時：3 月 18 日 11:00～ J 校舎 33 会場

*Bacteroides thetaiotaomicron* 由来マンノシル-β-1,4-*N*-アセチルグルコサミンホスホリラーゼの X 線結晶構造解析

Crystallography of Man-β-1,4-GlcNAc phosphorylase from *Bacteroides thetaiotaomicron*

○間島 滉一郎[1]、仁平 高則[2]、中井 博之[2]、北岡 本光[3]、荒川 孝俊[1]、伏信 進矢[1]([1]東大・院農、[2]新潟大農、[3]農研機構　食品研)

○Koichiro MAJIMA[1], Takanori NIHIRA[2], Hiroyuki NAKAI[2], Motomitsu KITAOKA[3], Takatoshi ARAKAWA[1], Shinya FUSHINOBU[1] ([1]Tokyo Univ., [2]Nigata Univ., [3]National Agriculture and Food Research Organization)

*N*-結合型糖鎖は生体内では膜貫通タンパク質等への接着を通じて様々な生命現象を制御している。これらの現象を分子レベルで解明し、*N*-結合型糖鎖を利用した疾患治療への応用が期待されている。近年、ヒト腸内グラム陰性嫌気性細菌 *Bacteroides thetaiotaomicron* のゲノム配列から、*N*-結合型糖鎖の代謝に関与すると考えられる遺伝子クラスターおよび マンノシル-β-1,4-*N*-アセチルグルコサミンホスホリラーゼ (ManGlcNAcP)BT_1033 が発見された。同じグリコシドヒドロラーゼファミリー130(GH130)に属する配列相同性の高い酵素としてメタゲノム由来の UhgbMP の立体構造が解明されているが、UhgbMP は*N*-結合型糖鎖のコンセンサス 3 糖であるマンノシル-β-1,4-*N*-キトビオースに対して高い加リン酸分解活性を示すことが明らかにされている。一方、BT_1033 は 2 糖であるマンノシル-β-1,4-*N*-アセチルグルコサミン(ManGlcNAc)を好む ManGlcNAcP である。これらのホスホリラーゼは逆反応も効率よく触媒するため、*N*-結合型糖鎖のコンセンサス構造となるオリゴ糖の実用的な酵素合成への利用が期待できる。そこで、本研究では BT_1033 の X 線結晶構造解析を行い、他の GH130 に属する酵素との比較から糖鎖長や基質特異性決定に重要な残基の特定を行った。

大腸菌 BL21(DE3)を宿主として $His_6$-tag 融合 BT_1033 を生産・精製し、精製タンパク質を用いて結晶化を行った。作製した BT_1033 の結晶を用いて KEK PF にて X 線回折実験を行った結果、分解能 2.4 Å でリガンドフリー状態の構造を決定した。

BT_1033 の全体構造は、他の GH130 ファミリーの酵素と同様に 5 枚羽の β-プロペラ構造をしていた。他の GH130 ファミリーに属する酵素の比較から、BT_1033 のサブサイト+1 において*N*-アセチル基が入ると考えられる部分には、バリンが存在し疎水的なスペースが確保されており、β-1,4-マンノオリゴ糖に特異性を示す GH130 ホスホリラーゼにおいて見られるアルギニンのようなかさ高い残基は見られなかった。この特徴が GlcNAc を受容するために必要であることが示唆される。また、UhgbMP においては、サブサイト+2 を形成する広い基質ポケットが存在するのに対して、BT_1033 においては残基 129-160 で構成されるループが活性部位の奥まで入り込み、サブサイト+2 ポケットを塞いでいた。以上より、２糖 ManGlcNAc に対して高い活性を示す BT_1033 の構造的基盤を明らかにした。

GH130, Man-β-1,4-GlcNAc, phosphorylase

講演番号：2J33a08
講演日時：3 月 18 日 11:15～ J 校舎 33 会場

# GH130_2 マンノシドホスホリラーゼの基質特異性に関与するアミノ酸残基
# Amino acid residues involved in substrate specificity of GH130_2 mannnoside phosphorylases

○播磨 晃帆[1]、佐分利 亘[2]、森 春英[2] ([1]北大農、[2]北大院農)
○Akiho HARIMA[1], Wataru SABURI[2], Haruhide MORI[2] ([1]Hokkaido Univ., [2]Hokkaido Grad.)

【背景と目的】
糖質加水分解酵素ファミリー130 (GH130) は，主に β-マンノシドホスホリラーゼからなる酵素群であり, 構造に基づき 3 つのサブファミリーGH130_1, GH130_2 および GH130_NC に分類される. GH130_1 酵素は Manβ1-4Glc 特異性を持つ．一方，GH130_2 は，活性既知の酵素として 3 酵素，すなわち *Ruminococcus albus* 由来 β-1,4-マンノオリゴ糖ホスホリラーゼ (RaMP2)，ヒト腸内細菌由来 β-1,4-マンノシルキトビオースホスホリラーゼ (Uhgb_MP), および *Bacteroides thetaiotaomicron* 由来 β-1,4-マンノシル-*N*-アセチルグルコサミンホスホリラーゼ (BT1033) を含み, いずれも β-マンノシド結合に作用する点で共通するが異なる基質特異性を示す．本研究では，GH130_2 の基質特異性に関与する構造因子の決定を目的とした．+1 サブサイトに注目し，RaMP2 の変異酵素を解析した．
【結果と考察】
Uhgb_MP では，Met67 および隣接サブユニットから伸びるループ (Pro200-Trp208) 上の Phe203 がサブサイト+1 の GlcNAc アセトアミド基と相互作用すると構造に基づき考えられている．該当残基は BT1033 でも保存される. RaMP2 では, 該当残基として Met75 は存在するが, ループは 4 残基短く Phe 残基も無い．そこで，RaMP2 の Met75 変異酵素 (M75P, M75A) および Uhgb_MP のループを導入した RaMP2 変異酵素 (loop) の精製標品を調製して解析した．基質を Man, GlcNAc, Glc, $Man_2$ および $(GlcNAc)_2$ とし，10 mM α-Man1*P* 存在下での β-マンノシド合成反応速度 (リン酸遊離速度) のみかけの速度定数を測定した. 変異酵素の活性は野生型よりも低く，Man に対する $k_{cat}/K_m$ 値は野生型の 11%(M75P)-2%(loop)であった．基質特異性は $k_{cat}/K_m$ 値に基づき評価した．野生型酵素では，Man を基準として Glc で 1.8 倍，GlcNAc と $(GlcNAc)_2$ で 1.1-1.3 倍であるのに対し，$Man_2$ に対しては 13 倍と高い特異性を示した. 変異酵素でも $Man_2$ に対する高い特異性に大きな変化はなかった(Man 比 13-22 倍). しかしながら，Met75 変異酵素では Man 比で Glc に対して 9-15 倍，GlcNAc に対して Man 比 19 倍もの高値を示し，$Man_2$ と同程度であった．この Loop 導入体のループ上の Phe に変異 (F→A)を導入すると，この GlcNAc に対する特異性は Man 比 2 倍にまで低下して野生型様となった．以上より，今回注目した Met 残基ならびにループとその上の Phe 残基が GH130_2 酵素の基質特異性決定に関わる重要な構造因子であると判断された.

Glycoside hydrolase family 130, Mannoside phosphorylase, Substrate specificity

発表責任者：播磨 晃帆（aqui_ho@eis.hokudai.ac.jp）

講演番号：2J33a09
講演日時：3 月 18 日 11:30～ J 校舎 33 会場

*Treponema caldarium* 由来β-1,3-oligoglucan phosphorylase 遺伝子の発現
Expression of β-1,3-oligoglucan phosphorylase gene from *Treponema caldarium*
○中越 麻里菜、谷 修治、炭谷 順一、川口 剛司 (阪府大院生環)
○Marina NAKAGOSHI, Shuji TANI, Jun-ichi SUMITANI, Takashi KAWAGUCHI (Osaka Pref. Univ.)

【背景と目的】グルコース（Glc）がβ-1,3 結合したオリゴ糖（ラミナリオリゴ糖, LO）には様々な生理活性が認められており，安価な合成法が望まれている。本研究では，LO を酵素的に合成する方法としてホスリラーゼに注目した。ホスホリラーゼは反応位置特異性が極めて厳密であり，また可逆反応酵素であり，反応系のリン酸濃度を調節することにより容易に平衡を合成反応側に傾けることができるため,選択的なオリゴ糖の合成への応用が期待されている。β-1,3 グルカンに作用するホスホリラーゼとして，Laminaribiose phosphorylase(LBP)とβ-1,3-oligoglucan phosphorylase(LOP)が一般的に知られており，前者はラミナリビオース(Lam2)に，後者は三糖以上の LO に対する加リン酸分解とその逆反応を触媒する酵素である。

*Euglena gracilis* Z 由来の LOP（EgLOP）は LBP 活性を有する LOP であることから，単独で安価な Glc からの LO 合成が期待できるが，安定性に問題がある。最近，当研究室において EgLOP をコードする遺伝子が同定された。EgLOP の推定されるアミノ酸配列は既知のホスホリラーゼとの相同性を示さなかったが，遺伝子配列により存在が推定されている機能未同定のタンパク質群と相同性が確認された。この機能未同定タンパク質群にはいくつかの好熱菌も存在しており，EgLOP よりも安定性が向上した酵素が存在している可能性が考えられた。そこで本研究では，*Treponema caldarium* に見出した EgLOP オルソログについて大腸菌を用いて異種発現を行い，発現産物の機能解析を行うことを目的とした。

【方法と結果】*C. caldarium* のゲノム DNA から PCR により目的遺伝子を取得した。C 末端側に His-tag が付加されるよう構築した発現プラスミドを用いて大腸菌 JM109 (DE3)株を形質転換し，30°C で培養することで目的遺伝子が可溶性タンパク質として発現した。無細胞抽出液を用いて，リン酸存在下で LO を加リン酸分解すること，α-D-グルコース-1-リン酸の存在下で Glc，Lam2 から脱リン酸合成を行うことを TLC により確認した。アフィニティ精製を行った発現産物について糖受容体特異性を検討したところ，Glc に対する Lam2 からの脱リン酸合成活性は 77.5%であり，本酵素の Glc と Lam2 に対する糖受容体特異性には大きな差がないことが明らかとなった。現在，さらに詳細な性質について検討しているところである。

phosphorylase, β-1,3-oligoglucan, laminarioligosaccharide

講演番号：2J33a10
講演日時：3 月 18 日 11:45～ J 校舎 33 会場

*Thermotoga maritima* 由来耐熱性マンノオリゴ糖ホスホリラーゼの機能解析
Functional analysis of thermostable mannooligosaccharide phosphorylase from *Thermotoga maritima.*

○中澤 篤志[1]、佐分利 亘[2]、吉田 靖彦[3]、津村 和伸[4]、伊吹 昌久[3]、森 春英[2]（[1]北大農、[2]北大院農、[3]不二製油株式会社、[4]不二製油グループ本社）
○ Atsushi NAKAZAWA[1], Wataru SABURI[2], Yasuhiko YOSHIDA[3], Kazunobu TSUMURA[4], Masahisa IBUKI[3], Haruhude MORI[2] ([1]Hokkaido Univ., [2]Hokkaido Grad., [3]FUJI OIL CO.,LTD., [4]FUJI OIL HOLDINGS INC.)

【目的】Mannooligosaccharide phosphorylase（MOP）は，β-(1→4)-マンノオリゴ糖(MOS)を加リン酸分解反応する．反応は可逆的であり逆反応（合成反応）も触媒する．糖質加水分解酵素ファミリー（GH）130 サブファミリー2 に分類され，ヒト腸内細菌由来 β-1,4-mannosylchitobiose phosphorylase（UhgbMP）や *B.thetaiotaomicron* 由来 β-1,4-mannosyl-*N*-acetylglucosamin phosphorylase（BT1033）などと配列類似性を示す．MOP は，合成反応により MOS 等の合成に応用可能であるが，これまでに機能解析されているのは *Ruminococcus albus* 由来の酵素 RaMP2 のみであり，これは熱安定性が低い．実用性の観点からは熱安定性・活性ともに高い酵素が望まれる．本研究では，好熱性細菌 *Thermotoga maritima* 由来の MOP 様タンパク質 TM1225(TmMOP)に注目し，組換え酵素を用いて機能解析を行った．
【結果・考察】組換えタンパク質は，大腸菌 BL21(DE3)形質転換体により生産し，熱処理(75˚C)および各種カラムクロマトグラフィーにより精製した．精製標品は MOP 活性を示し，D-Man および α-Man1*P* を基質として Pi および MOS(6 糖まで)を生成した．この合成反応速度(Pi 生成速度)への影響を解析した. 安定性は pH 4.0–9.0 の範囲(4˚C, 24 h)および 85˚C まで(pH 6.5, 15 min), 至適温度は 75˚C, 至適 pH は 6.5 であった．合成反応において，D-Man に加え，MOS 各種，D-Glc，D-Fru，L-Sor および GlcNAc を糖受容体として生成物を生じた．糖供与体を 10 mM Man1*P* とした 60˚C 反応において，見かけの $k_{cat}$ と $K_m$ は，D-Man に対してそれぞれ 348 $s^{-1}$，95.3 mM，MOS（2 糖から 6 糖）に対しては 72.8–109 $s^{-1}$, 2.65–3.23 mM であり, $k_{cat}/K_m$ は D-Man の値に比べて MOS では 738–1120％となり, RaMP2 および TM1225 同様に MOS に対する高い特異性を示した．一方単糖間では RaMP2 では D-Man よりも D-Glc 特異性が高いのに対して，本酵素 TmMOP は D-Man に対する特異性が最も高く，他の上記４基質に対して 28.8–3.4％の $k_{cat}/K_m$ 値を示した．
TmMOP の合成反応速度(MOP に対する $k_{cat}/K_m$ 値)は RaMP2 と同一反応条件(37˚C)で比べても 3.6–11 倍，TmMOP の 60˚C での速度だと 7.6–19 倍高い値となった．D-Man1*P* に対する見かけの $k_{cat}$ は高濃度 D-Man (400 mM 以上)で Michaelis Menten 式から逸脱して低下した. 速度論的には, 酵素への D-Man 2 分子の非生産的結合，および酵素に D-Man と Man1*P* が生産的結合をした 3 者複合体への D-Man 分子がもう 1 分子結合した不活性複合体に起因すると解釈された．ただし，見かけの $k_{cat}$ の低下は限定的であった．以上より本酵素 TmMOP は，熱安定性と高活性を備えた実用的な MOP 型酵素であると判断された．

Mannooligosaccharide phosphorylase, glycoside hydrolase family130, *Thermotoga maritima*

発表責任者：中澤篤志（atsushihokudai287@gmail.com）

講演番号：2J33p02
講演日時：3 月 18 日 14:15～ J 校舎 33 会場

# ヒト腸内細菌が有する母乳オリゴ糖分解酵素 LnbX ホモログの機能解析

# Functional analysis of lacto-*N*-biosidase homologs from human gut microbiota

○山田 千早[1]、伏信 進矢[2]、後藤 愛那[1]、加藤 紀彦[1]、片山 高嶺[1] ([1]京大院・生命研、[2]東大院・農生科)

○Chihaya Yamada[1], Shinya Fushinobu[2], Aina Gotoh[1], Toshihiko Katoh[1], Takane Katayama[1] ([1]Kyoto Univ., [2]The Univ. Tokyo)

ヒトの母乳中に含まれるオリゴ糖は、出生後間もない乳児の腸内にビフィズス菌を増殖・定着させるために機能していることが明らかとなってきた。これまでに 100 種類以上の分子種が同定されており、タイプ I (LNB, Gal-β1,3-GlcNAc 構造を有する)オリゴ糖の方が、タイプ II (LacNAc, Gal-β1,4-GlcNAc 構造を有する)オリゴ糖よりも含有量が高いことがヒト母乳オリゴ糖の特徴である。乳児の腸内に生息する数種のビフィズス菌は、タイプ I オリゴ糖に含まれる LNB 構造を切り出す酵素(ラクト-*N*-ビオシダーゼ, 以下 LNBase)を有しており、ヒト母乳オリゴ糖の資化に重要な役割を果たしている。LNB はビフィズス菌を特異的に増殖させる『ビフィズス因子』であると考えられており、LNB を含有する母乳オリゴ糖は成人にとっても腸内環境を整えるプレバイオティクスになることが期待されているが、ビフィズス菌以外の腸内細菌においての分布は特定の Bacteroides 属細菌や Firmicutes 門細菌を除いて詳しく調べられていなかった。

LNBase 遺伝子は *Bifidobacterium bifidum* および *B. longum* から単離されており、前者は Glycoside Hydrolase ファミリー20 に属する LNBase (LnbB)であるのに対し、後者はいずれのファミリーにも属さない新規な LNBase (LnbX)として分類されている。LnbB ホモログは腸内細菌ゲノム中では *B. bifidum* にのみ存在しているが、LnbX ホモログはいくつかの腸内細菌ゲノムに存在している。しかしながら、それらホモログが LNBase 活性を有するのかについては不明であった。最近、我々は LnbX の触媒ドメインを同定すると共にその X 線結晶構造解析を行った。そこで、LNB 複合体構造の情報を基に再度データーベースを精査したところ、ビフィズス菌以外の腸内細菌の LnbX ホモログにおいても、LNB の認識や触媒に関わる残基が高度に保存されていることが明らかとなった。そこで、それらのホモログを持ついくつかの腸内細菌について LNBase 活性を調べたところ、*Clostridium nexile* と *Ruminococcus lactaris* の菌体に活性が検出された。本報告では、これらホモログの遺伝子クローニング、大腸菌における組換え酵素の発現精製、および性状解析を報告する。

human milk oligosaccharides, lacto-*N*-biosidase, human gut microbiota

発表責任者：山田千早（chihaya.y@gmail.com）

講演番号：2J33p03
講演日時：3 月 18 日 14:30～ J 校舎 33 会場

# ムチン糖鎖に作用するビフィズス菌由来スルフォグリコシダーゼの同定と機能解析

# Identification and characterization of a mucin-degrading sulfoglycosidase from Bifidobacteria

○加藤 紀彦[1]、前渋 貴子[1]、吉川 慶一[2]、後藤 愛那[1]、苫米地 祐輔[2]、芦田 久[3]、山本 憲二[2]、片山 高嶺[1,2] ([1]京大院生命、[2]石川県大・生資環、[3]近畿大・生物理工)
○ Toshihiko KATOH[1], Takako MAESHIBU[1], keiichi KIKKAWA[2], Aina GOTOH[1], Yusuke TOMABECHI[2], Hisashi ASHIDA[3], Kenji YAMAMOTO[2], Takane KATAYAMA[1,2] ([1]Kyoto Univ., [2]Ishikawa Pref. Univ., [3]Kindai Univ.)

ヒト腸内におけるビフィズス菌の増殖・共生は乳児期に顕著に見られ、その後も一生に亘って継続する。共生を支える物質として、母乳中のヒトミルクオリゴ糖や食物由来成分以外に、ヒト腸管より分泌される粘膜の主要成分ムチンが知られている。我々のグループではこれまでに、ムチンタンパク質に付加した *O*-結合型糖鎖に作用して分解するビフィズス菌由来の様々なグリコシダーゼの単離と解析を行い、ビフィズス菌によるムチン糖鎖の分解経路を明らかにしてきた。しかしながら、ムチン糖鎖に多く見られる硫酸化糖鎖のビフィズス菌による分解活性は明らかではない。そこで、本研究ではビフィズス菌の硫酸化ムチン分解能と関連酵素について調べることとした。

硫酸化糖鎖として人工基質 *p*-nitrophenyl 6-sulfo-β-D-*N*-acetylglucosaminide （*p*NP-β-GlcNAc-6S）を用い、ビフィズス菌 14 菌株の抽出液についてその分解活性を調べたところ、*Bifidobacterium bifidum* JCM7004 株より GlcNAc-6S を遊離するスルフォグリコシダーゼ活性を見出した。スルフォグリコシダーゼは Prevotella 属細菌の *sgl* 遺伝子について報告があるが、Bifidobacterium 属細菌からは本発表が初の報告となる。*sgl* 遺伝子を query として *B. bifidum* JCM7004 ゲノムを BLAST 検索したところ、GH20 に分類される β-*N*-acetylglucosaminidase としてすでに報告されている *B. bifidum* JCM1254 由来 *BbhII* のホモログ遺伝子が最も高い相同性（28%）を示した。そこで *B. bifidum* JCM7004 株由来の *BbhII* ホモログ遺伝子を増幅し、His6 タグ融合タンパク質として大腸菌にて組換えタンパク質を発現、精製し、本酵素の加水分解活性を調べた。その結果、*p*NP-β-GlcNAc-6S に対する $K_m$ 値は 82 μM、$k_{cat}$ 値は 38 $s^{-1}$ で、$k_{cat}/K_m$ は *p*NP-β-GlcNAc に対する値（0.0011 $s^{-1}\mu M^{-1}$）と比べて約 420 倍高い数値を示した。したがって本酵素は GlcNAc-6S 残基に対して特異性を示すスルフォグリコシダーゼであった。またブタ胃ムチンに対して本酵素を作用させたところ、TLC 分析および HPLC 分析によって GlcNAc-6S の遊離を検出し、本酵素がムチンの糖鎖末端に存在する GlcNAc-6S 残基に対して作用することを見出した。本発見はビフィズス菌による硫酸化ムチンの新規な分解経路の存在を示唆するものである。

sulfoglycosidase, Bifidobacteria, mucin

発表責任者：加藤紀彦（tkatoh@lif.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2J33p04
講演日時：3 月 18 日 14:45～ J 校舎 33 会場

GH129 α-*N*-アセチルガラクトサミニダーゼの金属結合サイトと阻害剤を用いた解析
Metal binding site and inhibition analysis of GH129 α-*N*-acetylgalactosaminidase

○佐藤 真与[1]、LIEBSCHNER Dorothee[2]、山田 悠介[2]、松垣 直宏[2]、千田 俊哉[2]、荒川 孝俊[1]、芦田 久[3]、伏信 進矢[1] ([1]東大農、[2]高エネ研、[3]近大)
○Mayo SATO[1], Dorothee LIEBSCHNER[2], Yusuke YAMADA[2], Naohiro MATSUGAKI[2], Toshiya SENDA[2], Takatoshi ARAKAWA[1], Hisashi ASHIDA[3], Shinya FUSHINOBU[1] ([1]Univ. Tokyo, [2]KEK PF, [3]Kindai Univ.)

【概要】
ビフィズス菌はヒトの健康に有益な腸内細菌として知られている。小腸下部から大腸にかけての貧栄養環境中で生育するため、宿主や他細菌が利用しにくい難消化性の糖質に対する独特な代謝機構を複数有することが明らかにされてきた。本研究の対象であるα-*N*-アセチルガラクトサミニダーゼ(NagBb)は、消化管粘膜ムチンに由来する糖ペプチドを代謝する経路において菌体内で働く酵素であり、ペプチド鎖のSer/Thrに*O*-型で結合したα-*N*-アセチルガラクトサミン(GalNAc)を加水分解する。NagBbは既知の糖質加水分解酵素(GH)との配列相同性が低く、CAZyデータベースにおいて新規ファミリーGH129に分類された。以来、GH129において機能が同定されているのはNagBbのみであり、立体構造情報も皆無であった。我々はX線結晶構造解析により、NagBbの基質フリーとGalNAc複合体、2種類の立体構造を明らかにし、GH129ファミリー酵素に関する初の構造的知見を報告した（日本応用糖質科学会2016年度大会)。他のGHファミリーには例のない基質認識様式として、糖基質の*N*-アセチル基の認識に関わる金属サイトの存在が明らかとなったが、金属イオン種の同定には至っておらず、また反応機構についても不明確な点があった。本発表では、特異的な阻害剤を用いた活性測定に加えて、新たに得られた変異体および阻害剤複合体の立体構造、さらに異常分散回折測定によって明らかとなったNagBbの反応機構について、より詳細な報告を行う。

【方法】
*Bifidobacterium bifidum* JCM1254株由来の当該遺伝子をpET23bベクターに連結し、大腸菌C43(DE3)を宿主としてHis-Tag融合組換えNagBbタンパク質を調製し、精製酵素を得た。結晶化を行い、放射光施設でのX線回折実験により構造を決定した。変異体は野生型酵素と同様に調製した。活性測定の基質としては*p*NP-α-GalNAcを用いた。

【結果】
金属イオン配位子である全4残基をアラニン置換した変異体の結晶構造を明らかにし、糖基質認識における金属イオンの重要性を確認した。長波長で取得した異常分散回折データにより、この金属が$Ca^{2+}$であると判定した。GalNAc-thiazoline、GalNAc-DNJ、Gal-PUGNAc、各阻害剤による活性測定を行い、NagBbがα-グリコシダーゼとしての特性を持ち、基質補助型機構ではなく一般的な保持型グリコシダーゼの反応機構を持つことを確認した。

Glycoside hydrolase, X-ray crystal structure, Bifidobacteria

講演番号：2J33p05
講演日時：3 月 18 日 15:00～ J 校舎 33 会場

ヒト腸内細菌 *Prevotella copri* 由来の変異型キシラナーゼ 10B(Xyn10B)の特性解析
Characterization of mutant xylanase 10B (Xyn10B) from human intestinal bacteria *Prevotella copri*.

○小黒 弘貴[1]、小林 海渡[1]、吉村 弥生[3]、林 史夫[4]、松尾 一郎[3]、林 秀謙[1,2]([1]前工大院工、[2]前工大工、[3]群大院理工、[4]群大・機器分析)
○Hiroki Oguro[1], Kaito Kobayashi[1], Yayoi Yoshimura[3], Fumio Hayashi[4], Ichiro Matsuo[3], Hidenori Hayashi[1,2] ([1]Grad. Maebashi institute of technology., [2]Maebashi institute of technology., [3]Grad. Gunma Univ., [4]Gunma Univ.)

【背景・目的】ヒトの腸内細菌である *Privotella copri* はゲノム DNA 上に複数のキシラナーゼをコードしている。そのうちの 1 つ Xyn10B は、ファミリー10 に属する触媒ドメインが Carbohydrate binding module(CBM)で分断されているという珍しい構造を有している。本研究では、Xyn10B の触媒ドメインの前半と後半の相補性及び、CBM 欠損型 Xyn10B の諸性質の解析を目的とする。
【方法】*P.copri* の Xyn10B の触媒ドメインの前半と後半を大腸菌内で発現させ、プレートアッセイによりキシラナーゼ活性を定性的に確認した。発現タンパク質をアフィニティークロマトグラフィーにより精製し、至適条件、安定性、熱・酸・塩基変性後の活性の復帰の追跡、サーマルサバイバル、基質特異性、*K*m、*V*max、分解産物の解析、CD スペクトルの解析を行った。
【結果及び考察】プレートアッセイの結果、CBM 欠損型 Xyn10B 発現大腸菌からキシラナーゼ活性が確認できた。至適条件は 55℃、pH6.0 であった。安定性は 20～60℃、pH2.5～11.5 の間で 80%以上の活性を保持し、冷却時間や pH6.0 処理の時間の増加に伴い活性は復帰し、20～90℃、pH1.5～11.5 の間で 80%以上の活性を示した。至適条件については野生型と大きな差はなかったが、活性が復帰するという結果から安定性は向上した。これは CBM を欠損させたことにより三次構造が最適化され、巻き戻りの機能を得たためだと考えられる。サーマルサバイバルの結果、半減期($t_{1/2}$)は 80℃で 137.7 分、100℃で 41.9 分であった。基質特異性は Birchwood xylan に対しては比活性が 21.37±1.94 U/mg、Beechwood xylan は 43.03±0.76 U/mg、Oat-spelt xylan は 57.08±1.34 U/mg であった。Carboxymethylcellulose、*p*NP-α-arabinofuranoside、*p*NP-β-cellobioside、*p*NP-β-glucoside、*p*NP-β-xylopyranoside に対する活性は見られなかった。Beechwood xylan を基質としたときの *K*m 値は 56.67 mg/mL、*V*max 値は 416.67 μmol/min/mg、Oat-spelt xylan を基質としたときの *K*m 値は 98 .00 mg/mL、*V*max 値は 769.23 μmol/min/mg であった。キシロオリゴ糖(X2～X6)を用いた分解産物の解析では、X3 以上の鎖長での主な分解産物として X2、X1 が検出され、X2 においては X1 が見られず分解は確認できなかった。Beechwood xylan と Oat-spelt xylan の分解産物の解析では、X4、X3、X2 が主な分解産物であった。CD スペクトルの解析の結果から、α ヘリックス、β シートに富んだ構造をしており、加熱に伴い二次構造が大きく変化し、加熱後の冷却によって加熱前の状態に二次構造は近づいた。つまり、冷却による巻き戻りが確認できた。

xylanase, glycoside hydrolase, GH10

発表責任者：小黒 弘貴（m1566003@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：2J33p06
講演日時：3 月 18 日 15:25～ J 校舎 33 会場

*B. longum* JCM1217 由来 GH127 β-L-アラビノフラノシダーゼ (HypBA1)の機能構造解析
Functional and structural analysis of GH127 ß-L-arabinofuranosidase (HypBA1) from *B. longum* JCM1217

○丸山 瞬[1]、伊藤 佑[1]、藤田 清貴[2]、石渡 明弘[3]、伊藤 幸成[3]、荒川 孝俊[1]、伏信 進矢[1]([1]東大院農生科、[2]鹿児島大生物資源化学科、[3]理研)
○Shun Maruyama[1], Tasuku Ito[1], Kiyotaka Fujita[2], Akihiro Ishiwata[3], Yukishige Ito[3], Takatoshi Arakawa[1], Shinya Fushinobu[1] ([1]Tokyo Univ., [2]Kagoshima Univ., [3]RIKEN)

【概要】植物はヒドロキシプロリン(Hyp)に富む糖タンパク質(hydroxyproline-rich glycoproteins: HRGP)を様々な生物学的プロセスに利用している。植物細胞壁には構造タンパク質であるエクステンシンという HRGP が含まれている。その Hyp 残基には最大 4 単位のアラビノフラノース (Ara*f*) からなる β-アラビノオリゴ糖鎖が結合している (Ara*f*-α 1,3-Ara*f*-β 1,2-Ara*f*-β 1,2-Ara*f*-β-Hyp: $Ara_4$-Hyp)。2011 年に *B. longum* から $Ara_4$-Hyp などを分解し取り込む経路の関連遺伝子群が発見され、ここに含まれる酵素群の中から、β 結合した Ara*f* からなるオリゴ糖に対して分解活性を示す、GH127 β-アラビノフラノシダーゼ (HypBA1)が同定され機能解析された。β-アラビノオリゴ糖に対して作用する酵素はこれまで報告がなく、HypBA1 が初めての発見であった。また、植物の糖タンパク質の β-アラビノオリゴ糖鎖を加水分解する酵素としても初めてであった。

当研究室では HypBA1 の X 線結晶構造解析が行われ、アポ状態と β-L-Ara*f* 複合体の結晶構造が決定された。亜鉛イオンに配位している Cys417 が求核触媒残基として反応に関わると考えられ、糖加水分解酵素としては初めてのシステイングリコシダーゼではないかと想起されたが類似の活性中心を持つ酵素の前例が知られていないために様々な角度からの検証が必要である。本研究では HypBA1 と基質の複合体構造を得ることでその反応機構をより詳細に調べることを目的とした。

【方法】*B. longum* JCM1217 由来 GH127 β-L-アラビノフラノシダーゼの一般酸塩基触媒残基 E322 の変異体遺伝子 *HypBA1_E322Q* を pET23b に組み込み、大腸菌 C43 (DE3)を宿主として $His_6$-tag 融合 E322Q 変異体の発現を行った。得られたタンパク質を Ni アフィニティクロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製し、結晶化を行った。作製した結晶に合成基質 *p*NP-β-Ara*f* をソーキングし、KEK PF にて X 線回折実験を行った。また、同様の方法で HypBA1_Y386F についても発現、精製を行い、*p*NP-β-Ara*f* を用いて活性測定を行った。

【結果】E322Q と基質 *p*NP-β-Ara*f* の複合体構造を 2.6Å の分解能で決定した。アポ構造とは異なり、活性中心を含むループが見えたものの、活性中心を覆うループがディスオーダーしていた。また新たに Y386 が求核基の近傍にあることが判明した。しかし Y386F を用いた活性測定では、野生株の約半分の活性を示し、触媒において重要な役割は担っていないことがわかった。

β-L-arabinofuranosidase, extensin, hydroxyproline

発表責任者：丸山瞬（shunmagri1210@gmail.com）

講演番号：2J33p07
講演日時：3 月 18 日 15:40～ J 校舎 33 会場

*Bifidobacterium longum* subsp. *longum* の II 型アラビノガラクタン分解酵素群の解析
Characterization of the degradative enzymes for type-II arabinogalactan in *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*.
○藤田 清貴、坂本 彩美、嵩下 愛果、東郷 奈未、北原 兼文 (鹿児島大・農)
○ Kiyotaka Fujita, Ayami Sakamoto, Aimi Dakeshita, Nami Togo, Kanefumi Kitahara (Kagoshima Univ.)

【目的】我々は、*Bifidobacterium longum* subsp. *longum* (*B. longum*)由来のⅡ型アラビノガラクタン（Ⅱ型 AG）分解酵素群である GH43_24 exo-β-1,3-galactanase(BLLJ_1840)、GH30_5 β-1,6-galactanase (BLLJ_1841)、GH43_22 α-L-arabinofuranosidase(BLLJ_1841)の性質決定を行い、*B. longum* におけるⅡ型 AG 分解代謝経路の全容を解明した(1)。ビフィズス菌の中で唯一 *B. longum* だけがカラマツ由来のⅡ型 AG(LWAG)を資化することができ、KEGG データベース上のビフィズス菌の中で唯一 *B. longum* だけがⅡ型 AG 分解酵素群をコードしている。そこで、本研究では *B. longum* の菌体表層で本酵素群が実際にⅡ型 AG の分解を担っていることを明らかにすることを目的として、組換え酵素と *B. longum* 培養菌体の LWAG 分解性の比較を行った。

【方法】組換え BLLJ_1840、BLLJ_1841、BLLJ_1854 を相加的に LWAG に作用させ、その遊離糖を HPAEC-PAD で解析した。また、LWAG を炭素源として培養した *B. longum* JCM1217 の洗菌菌体を LWAG に作用させて遊離糖を解析した。

【結果】Ⅱ型 AG 分解酵素群を相加的に LWAG に作用させた時の主要な最終産物は、Galβ1,6Gal(β1,6-$Gal_2$)であった。洗菌菌体を作用させた場合もβ1,6-$Gal_2$ が確認された。β1,6-$Gal_2$ は徐々に Gal に分解されたことから、他のβ-galactosidase の作用を受けたものと予想された。BLLJ_1840、BLLJ_1841、BLLJ_1854 遺伝子共に LWAG を炭素源として培養した *B. longum* において転写量の増加が確認されているため、本酵素群が実際に *B. longum* 菌体表層でのⅡ型 AG の分解代謝を担っているものと考えられる。

1) Fujita, K. *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 80, 4577 (2014).

Bifidobacteria, arabinogalactan, arabinofuranosidase

発表責任者：藤田清貴（k4022897@kadai.jp）

講演番号：2J33p08
講演日時：3 月 18 日 15:55～ J 校舎 33 会場

# エリシター遊離活性をもつ二種類のダイズ由来グルカナーゼの機能

# Function of two glucanases with elicitor-releasing activity from Soybean (*Glycine max*).

○高島 智也、大沼 貴之、深溝 慶（近大院農）
○Tomoya TAKASHIMA, Takayuki OHNUMA, Tamo Fukamizo (Kindai Univ.)

［緒言］植物は植物病原菌の感染に対し、高度な生体防御機構を備えている。一方病原菌は、それらを阻害、回避するような戦略をとり、感染を成立させようとする。両者の接触面では、植物および病原菌の細胞壁を分解する糖質加水分解酵素が分泌され、生体防御もしくは感染成立に大きな役割を果たすことが知られている。ダイズ(*Glycine max*)はダイズ疫病菌（*Phytopthora sojae*）の感染に対して、二種類のβ-1,3-グルカナーゼ(EC 3.2.1.39) EGaseA と EGaseB を発現する。両酵素は疫病菌の細胞壁構成成分であるβ-グルカンを分解し、同時にβ-1,6 およびβ-1,3 結合で連結したβ-グルカンオリゴ糖エリシターを遊離する活性をもつ（Rose *et al.*, *Plant Cell*, 2002）。両酵素は糖質加水分解酵素の分類 CAZy データベース上では Family GH17 に分類されている。本研究ではダイズによるβ-グルカンオリゴ糖エリシターの生成機構を明らかにするために、EGaseA と EGaseB の酵素学的性質を明らかにすることを目的とした。

［方法と結果］Legume Base より、EGaseA と EGaseB をコードする遺伝子をもつプラスミド GMFL01-19-B17 と GMFL02-15-A12 を取得した。EGaseB については部分配列のみ公開されていたので、全長の遺伝子配列を決定した。その結果、両酵素のアミノ酸配列の同一性は 49%であることがわかった。 pRam-NHis 発現ベクターと大腸菌 C41 株を用いた発現系を構築し、組換え型 EGaseA と EGaseB を発現させた。両酵素はニッケルアフィニティおよびゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより、SDS-PAGE 上で均一なまでに精製した。カルボキシメチルカードラン（CM-カードラン）を基質に用いて、還元糖定量法により両酵素の分解活性を調べた。その結果、反応時間の経過に伴い還元糖量が増加したことから、EGaseA と EGaseB はβ-1,3 グルカナーゼ活性を示す酵素であることがわかった。また、EGaseA が EGaseB より 25 倍程度高い活性を示した。ラミナリオリゴ糖（2～6 糖）を各酵素に反応させ、分解産物を TLC で解析した結果、EGaseA がエキソ型、EGaseB がエンド型酵素であることが示唆された。また EGaseA は顕著な糖転移活性を示し、反応産物として 7～11 糖が検出されたが、EGaseB からはそのような活性は検出されなかった。蒸気拡散法による結晶化条件のスクリーニングを行ったところ、複数条件下で EGaseA と EGaseB の結晶を得た。現在 X 線結晶構造解析法により、両酵素の立体構造解析を進めている。

Soybean, glucanase, elisitor

講演番号：2J33p09
講演日時：3 月 18 日 16:10～ J 校舎 33 会場

# エンド - １，３ - β - グルカナーゼ触媒ドメインの機能構造解析

# Functional structure analysis of catalytic domain of endo-1,3-ß-glucanase

○三木 彩子[1]、稲葉 理美[1]、櫻井 一正[2]、池上 貴久[3]、伊島 理枝子[4]、織田 昌幸[1] ([1]京府大・院生命環境科学、[2]近畿大・高圧蛋白研、[3]横浜市大・生命医科、[4]ピッツバーグ大学・構造生物学)
○Ayako MIKI[1], Satomi INABA[1], Kazumasa SAKURAI[2], Takahisa IKEGAMI[3], Rieko ISHIMA[4], Masayuki ODA[1] ([1]Grad. Sch. of Life and Environ. Sci., Kyoto Pref. Univ., [2]High Pressure Protein Res. Center, Kindai Univ., [3]Grad. Sch. of Med. Life Sci., Yokohama City Univ., [4]Dept. of Struct. Biol., Univ. of Pitts.)

【背景・目的】タンパク質は大多数のエネルギー的に最安定な構造のほかに、わずかに不安定な準安定構造が少数存在する。それら準安定構造や溶液中での「動き」がタンパク質の機能に重要と考えられる。核磁気共鳴法 (NMR) を用いる最大の利点は、溶液中でのタンパク質の動きに関する情報を、部位特異的に得られることである。また、圧力をかけることで、タンパク質の体積が変化し、エネルギー的に不安定な構造の存在比率を上げることができる。本研究では、*Cellulosimicrobium Cellulans* DK-1 由来の糖加水分解酵素、endo-1,3-β-glucanase 触媒ドメインの不活性型変異体 E119A を対象とした。本触媒ドメインは、Glycoside hydrolases (GH) 16 に属し、保存された E-X-D-X-(M)-E という触媒モチーフをもつ。糖との結合状態を観測するために糖滴定実験を、また非結合状態での高圧実験を行い、各スペクトル変化の比較から機能構造の観測を試みた。
【結果・考察】3 次元 NMR 測定により、27 kDa という分子量の大きなタンパク質のシグナル帰属を行い、触媒モチーフを含む全残基主鎖の 70%の帰属が完了した。さらに、糖滴定実験と高圧力条件下のスペクトルの比較により、残基単位、または原子単位での結合への寄与を評価した。糖滴定実験では、触媒モチーフを含むいくつかの残基で、0.5 当量から 1.0 当量の糖存在下で、大きなケミカルシフト変化やブロードニングが見られた。高圧条件下において、通常のタンパク質の体積圧縮とは異なるスペクトルの変化がいくつかの残基で観測された。これらの残基は、タンパク質の機能に重要な役割を果たすと考えられる。両実験ともに、触媒モチーフとその周辺の糖結合に関わる残基や糖結合サイトのループ領域だけでなく、結合サイトの裏側など周辺領域でケミカルシフト変化が見られた。糖結合サイト付近の残基だけでなく、構造全体が糖を包むように結合する可能性が示唆された。

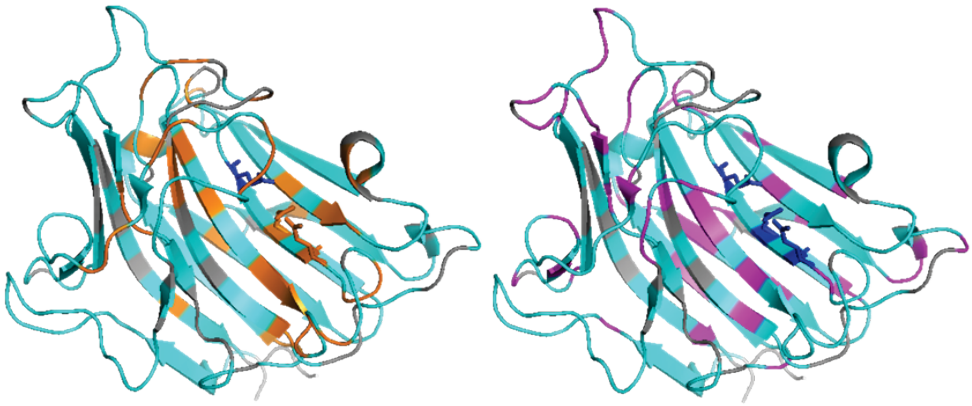


Fig. Endo-1,3-β-glucanase の結晶構造 (PDB-ID: 3atg)、触媒モチーフをスティック、帰属されていない残基をグレー、糖滴定実験で変化した残基をオレンジ (左)、高圧実験で変化した残基をピンク (右) で示した。

catalytic motif, structure-function relationship, structural dynamics

発表責任者：織田昌幸（oda@kpu.ac.jp）

講演番号：2J33p10
講演日時：3 月 18 日 16:25～ J 校舎 33 会場

*Vibrio* 由来 glycoside hydrolase family 17 の機能未知な C 末端領域は酵素活性の発現に必須である
Unknown C-terminal region of glycoside hydrolase family 17 ß-1,3-glucanase from *Vibrio* sp. is essential for enzyme activity

○熊谷 祐也、田上 貴祥、奥山 正幸、木村 淳夫 (北大院農)
○Yuya Kumagai, Takayoshi Tagami, Masayuki Okuyama, Atsuo Kimura (Hokkaido Univ.)

【背景】糖質関連酵素は生理的な環境でその機能を発現するため、糖質結合モジュールなどの様々なドメインの付随により局在性を決定し、基質への特異性を高める。一方、その機能が未知なドメインも多く存在する。glycoside hydrolase family 17(GH17)酵素はβ-(1,3)-グルコシド結合に作用し、加水分解あるいは糖転移によりβ-(1,6)-グルコシド結合の合成を触媒する。GH17 酵素は植物および微生物に広く分布しており、微生物酵素は真菌の細胞壁を加水分解することで自己防御や炭素源獲得を行うと考えられるがそれらに関する知見は少ない。現時点の CAZY データベースには 626 個の GH17 微生物酵素が掲載され（フラグメントを除く)、うち 53 個は触媒ドメインのみであり、その他は触媒ドメイン（約 300 アミノ酸残基）に 200-500 残基を余分に持つ。*Vibrio vulnificus* 由来の GH17 に属する hypothetical protein(VvGH17)は全長 615 残基から成り、シグナルペプチド(1-22 番アミノ酸)、N 末端領域（23-47)、触媒ドメイン（48-382)、および機能未知の C 末端領域（383-615）から構成される。機能未知の C 末端領域は相同性検索やモチーフ検索では作用が判定できなかったが、二次構造予測からβ-シート構造を多く有すると予想された。VvGH17 は系統樹解析から触媒ドメインのみの酵素と同じ分枝に含まれる。今回、C 末端領域が特徴的な機能を持つと考え解析を行った。
【方法・結果】VvGH17 は大腸菌発現系により作製し、機能解析を試みた。VvGH17 はβ-(1,3)-グルコシド結合から成るラミナリンやカードランを加水分解したが、β-(1,4)-グルコシド結合が混在するリケナンやβ-グルカン、およびβ-(1,6)-グルコシド結合が主鎖に含まれる酵母由来β-グルカンに対して加水分解活性を示さなかった。ゲルろ過クロマトグラフィーから VvGH17 はラミナリンをエンド型に分解することが分かり、以上の性質から VvGH17 は glucan endo-1,3-β-D-glucosidase（EC 3.2.1.39）に分類した。VvGH17 の N 末端側（23-435 番アミノ酸：触媒ドメインを含む）および C 末端側（430-615 番アミノ酸）の組換え体はそれぞれ可溶性タンパク質として得られたが、単独の解析では酵素活性を示さなかった。しかしながら両タンパク質を共存させた反応系では酵素活性が観察されたことから C 末端側は酵素活性の発現に必須な領域であることが分かった。ゲルろ過クロマトグラフィーから VvGH17 に多量体形成を確認したが、N 末端側および C 末端側のみでは多量体を形成しなかった。N および C 末端側の共存（混合体）も多量体を形成しないことから、C 末端側は基質結合に関与すると予測された。

glycoside hydrolase family 17, beta-1,3-glucan, Vibrio

発表責任者：熊谷祐也（ykumagai@abs.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：2J33p11
講演日時：3 月 18 日 16:50～ J 校舎 33 会場

*Talaromyces funiculosus* 由来 β-1,2-グルカナーゼの複合体構造
The complex structures of ß-1,2-glucanase from *Talaromyces funiculosus* .
○田中 信清[1]、阿部 紘一[1]、中島 将博[1]、中井 博之[2]、宮永 顕正[3]、田口 速男[1] ([1]東理大院、[2]新潟大、[3]東工大)
○NOBUKIYO TANAKA[1], KOICHI ABE[1], MASAHIRO NAKAJIMA[1], HIROYUKI NAKAI[2], AKIMASA MIYANAGA[3], HAYAO TAGUCHI[1] ([1]Tokyo Univ of Sci., [2]Niigata Univ., [3]Tokyo Tech.)

【目的】β-1,2-グルカンはグルコースがβ-1,2-結合により連なった多糖であり、微生物の分泌する環状糖としての存在が主に知られ、宿主との共生や宿主免疫系からの回避などに重要とされている。しかし、β-1,2-グルカン分解酵素の報告例はきわめて少ない。私たちは、これまでに糸状菌 *Talaromyces funiculosus* よりβ-1,2-グルカナーゼ(*Tf*SGL)を単離同定し、これが新規糖質加水分解酵素ファミリーとなり得る全くの新規配列を有すること、アノマー反転型酵素であることを明らかにしている。本研究では、さらに本酵素の立体構造、基質認識機構、反応機構の解明を目指して X 線結晶構造解析を行った。
【方法】*Tf*SGL は酵母を宿主とした大量発現系により生産した。*N* 結合型糖鎖除去とニッケルカラム精製により調製した酵素を結晶化に用い、ヨウ素を用いた SAD 法により初期位相を決定した。反応生成物との複合体構造は野生型 *Tf*SGL 結晶へのβ-1,2-グルコ 2 糖及び 4 糖 (それぞれ $Sop_2$ と $Sop_4$)のソーキングにより得た。また、基質との複合体構造はβ-1,2-グルカン分解活性が顕著に低下した E241Q 変異体の結晶へのβ-1,2-グルカンのソーキングにより取得した。
【結果】*Tf*SGL は$(\alpha/\alpha)_6$ toroid fold の全体構造を有しており、アミノ酸配列が全く異なるグラム陰性菌 *Chitinophaga pinensis* 由来β-1,2-グルカナーゼと高い全体構造の類似性を示した。基質ポケット内には 4 つの酸性アミノ酸残基が存在しており、これらの変異体 (D156N, E159A, E241Q, D425N)では E159A をのぞく全てにおいて顕著なβ-1,2-グルカン分解活性の減少がみられた。E241Q 変異体とβ-1,2-グルカンとの複合体構造では 5 糖部分の電子密度が明確に観察された。この基質のグルコース部分の一つの立体配座が $^1S_3$ に歪んでおり、この位置がサブサイト−1 と考えられる。また、残りのグルコース部分の位置は *Tf*SGL-$Sop_2$, $Sop_4$ 複合体のものとほぼ一致していた。E241Q-β-1,2-グルカン複合体では、サブサイト−1 のアノマー位炭素原子へ求核攻撃可能な位置に水分子が観察されたが、この水分子は酸性残基と直接相互作用していなかった。ゆえに求核性水分子の直接の活性化は酸性触媒残基以外のものにより行われると考えられる。更に、基質切断部位の酸素原子への直接のプロトン供与が可能な位置には基質のサブサイト+1 や+2 の 3 位 OH 基のみが存在しており、この OH 基に酸性アミノ酸残基が水素結合していた。このことから、この OH 基を介して一般酸触媒が間接的にプロトンを供給していることが考えられ、*Tf*SGL は一般的なアノマー反転型酵素とは全く異なる反応機構を有することが示唆された。

β-1,2-glucanase, ß-1,2-glucan, *Talaromyces funiculosus*

発表責任者：田中信清（6416705@ed.tus.ac.jp）

講演番号：2J33p12
講演日時：3 月 18 日 17:05～ J 校舎 33 会場

# 担子菌 *Coprinopsis cinerea* 由来α-L-アラビノフラノシダーゼ CcAbf62A の触媒ドメインのX線結晶構造解析

# Crystal structure of the catalytic domain of α-L-arabinofuranosidase, CcAbf62A, from a basidiomycete, *Coprinopsis cinerea*

○殿塚 隆史[1]、田中 祐太郎[1]、奥山 舜朔[1]、宮崎 剛亜[1]、西河 淳[1]、吉田 誠[2]([1]東京農工大院応生化、[2]東京農工大院環境資源)
○Takashi Tonozuka[1], Yutaro Tanaka[1], Shunsaku Okuyama[1], Takatsugu Miyazaki[1], Atsushi Nishikawa[1], Makoto Yoshida[2] ([1]Dept. Applied Biological Science, Tokyo Univ. of A&T, [2]Dept. Environmental and Natural Resource Science, Tokyo Univ. of A&T)

【目的】糖質加水分解酵素ファミリー（GH）62 に属するα-L-アラビノフラノシダーゼは、キシラン鎖にα-1,2-およびα-1,3-結合しているL-アラビノフラノースを、加水分解により遊離させる性質を持ち、ヘミセルロースの分解に有用な酵素である。担子菌 *Coprinopsis cinerea* 由来酵素 CcAbf62A は、N 末端側の糖結合モジュール（CBM1）と C 末端の触媒ドメインから構成されている。本研究では、CcAbf62A 触媒ドメインの立体構造を決定したので報告する。

【方法】CcAbf62A の触媒ドメインの cDNA と pET21a プラスミドを用いて、大腸菌による発現系を構築した。Ni-NTA アガロースによるアフィニティークロマトグラフィーによって酵素を精製し、結晶化を行った。高エネルギー加速器研究機構 PF-AR NW12A ビームラインにて回折強度データを収集し、既知の GH62 の構造を鋳型とした分子置換法により立体構造を決定した。

【結果と考察】CcAbf62A は他の GH62 酵素と同様、5 葉のβ-プロペラフォールドの触媒ドメインを有していた。CcAbf62A の活性中心付近のアミノ酸残基は、他の GH62 酵素にもほぼ保存されていた。しかし、活性中心のカルシウム原子はアスパラギン残基 Asn279 と結合しており、この残基は他の GH62 では Cys または Gln であった。また、CcAbf62A のサブサイト+3R、+2NR、+3NR、および+4NR のいくつかの残基は、他の GH62 酵素では保存されていなかった。特に His221 は、CcAbf62A のサブサイト+2NR に特有であり、本酵素の基質特異性に重要な役割を果たしていると考えられた。本研究から、GH62 に属する酵素は全体の構造は互いに類似しているが、キシラン鎖を認識するアミノ酸残基には多様性があることが明らかになった。

*Coprinopsis cinerea*, α-L-arabinofuranosidase, GH62

発表責任者：殿塚隆史（tonozuka@cc.tuat.ac.jp）

講演番号：2J33p13
講演日時：3 月 18 日 17:20～ J 校舎 33 会場

# *Falsirhodobacter* sp. alg1 由来のアルギン酸リアーゼによる 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid の調製

# Preparation of 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid using alginate lyases from *Falsirhodobacter* sp. alg1

○村瀬 祥光[1]、柴田 敏行[1]、モリ テツシ[2]、田中 礼二[1]、植田 充美[3]、三宅 英雄[1,4]（[1]三重大院生資、[2]早大理工学術院、[3]京大院農、[4]三重大生命支セ）
○Yoshihiro MURASE[1], Toshiyuki SHIBATA[1], Tetsushi MORI[2], Reiji TANAKA[1], Mitsuyoshi UEDA[3], Hideo MIYAKE[1,4] ([1]Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ., [2]Fac. Sci. and Eng., Waseda Univ., [3]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [4]Life Sci. Res. Center, Mie Univ.)

【背景・目的】褐藻類は世界の水生植物の約 7 割を占め、その主要構成多糖はアルギン酸である。褐藻類を資化する微生物を対象としたメタゲノム解析およびゲノム解析によって、*Falsirhodobacter* sp. alg1 は有力なアルギン酸資化微生物であることを発見した。*Falsirhodobacter* sp. alg1 には、エンド型アルギン酸リアーゼ遺伝子（*alyFRA*）とエキソ型アルギン酸リアーゼ遺伝子（*alyFRB*）が存在し、PL7 および PL15 ファミリーに属する。基質であるアルギン酸は、エンドおよびエキソ型アルギン酸リアーゼによって不飽和単糖を生成し、その後、不飽和二重結合が開裂することで 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid（DEH）に変換される。そこで本研究では、AlyFRA と AlyFRB の組換え体を作製し、これら 2 種のアルギン酸リアーゼを用いた DEH の調製を試みた。

【方法・結果】*alyFRA* と *alyFRB* の大腸菌発現プラスミドを作製し、BL21(DE3)に形質転換した。それぞれの形質転換体の培養を行い、菌体から目的タンパク質を可溶化させ、単一になるまで精製を行った。作製した精製酵素の収量は、培地 1 L あたり AlyFRA は 4.7 mg、AlyFRB は 10.0 mg 得ることができた。

作製した精製酵素とアルギン酸ナトリウムを反応させ、それぞれの反応液を TLC に供した結果、AlyFRA では複数のアルギン酸オリゴ糖を検出した。AlyFRB ではグルコースの位置に近いところにスポットを検出し、AlyFRA と AlyFRB の両方の組み合わせでは AlyFRB のみの時と同等の位置にスポットを検出した。さらに、AlyFRA と、AlyFRA と AlyFRB の両方を用いた時の反応液を LC/MS で分析した結果、どちらもトータルイオンクロマトグラムで 1 ピークのみを検出し、*m/z*=175 での選択イオン検出法からこれらの生成物は DEH であった。さらに、AlyFRA のみ、AlyFRB のみ、AlyFRA と AlyFRB の両方の 3 通りの酵素の組み合わせでアルギン酸ナトリウムと反応させ、それぞれの生成物の収率を算出した。その結果、AlyFRA ではアルギン酸オリゴ糖を 76.6 %、AlyFRB では DEH のみを 31.7 %、AlyFRA と AlyFRB の両方では DEH のみを 86.8 %の収率で得ることができた。以上の結果から、AlyFRA と AlyFRB の両方の酵素を用いることによって高い収率で DEH を調製することができた。

polysaccharide lyase, alginate lyase, DEH

発表責任者：三宅英雄（miyake@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：2J33p14
講演日時：3 月 18 日 17:35～ J 校舎 33 会場

糖供与体選択性の異なるβ-グルコシダーゼが触媒する L-アスコルビン酸への糖転移反応の速度論的研究
Kinetic study of transglycosylation of L-ascorbic acid catalyzed by ß-glucosidases with different sugar donor specificity
○菅沼 笙子、寺坂 美紀、仁戸田 照彦、神崎 浩（岡山大院環境生命）
○Shoko SUGANUMA, Miki TERASAKA, Teruhiko NITODA, Hiroshi KANZAKI (Grad. Sch., Environ. Life Sci., Okayama Univ.)

【目的】我々はアスコルビン酸（AA)配糖体を合成する酵素の探索を行う中で，糖質加水分解酵素ファミリー3 (GH3)に属する *Aspergillus niger* 由来β-グルコシダーゼが AA の 6 位水酸基への位置特異的な糖転移反応を触媒し，アスコルビン酸 6βグルコシド（AA6βGlc)を優先的に生成することを見出した。続いて異なる生物種由来のβ-グルコシダーゼを精製し，AA への糖転移活性の特徴を比較した結果，GH3 に属する菌由来酵素の中でも糖転移活性の大きさ，配糖化位置選択性，基質特異性により細分類できることが分かった。その過程で *Penicillium multicolor* から見出したβ-グルコシダーゼの一つは，配糖化位置として AA の 2 位水酸基よりも 6 位水酸基を優先する点では *A. niger* 由来酵素と共通していたが，その基質特異性は全く異なることが分かった。*A. niger* 由来酵素はセロオリゴ糖，結合位置の異なるβ-グルコ二糖および *p*-nitrophenyl β-D-glucopyranoside (*p*NPG)や indican などの芳香族配糖体の全てを糖供与体として利用できるのに対し，*P. multicolor* 由来酵素は芳香族配糖体に高い特異性を示し，セロオリゴ糖やβ-グルコ二糖を糖供与体として利用できないというユニークな糖供与体選択性を示した [1]。今回 AA への糖転移反応における速度論的特徴から本酵素の新奇性を確証することを目的とし，*p*NPG と cellobiose を糖供与体とした速度論的解析を行った。
【方法・結果】*A. niger* 由来酵素は固体培養抽出液から，*P. multicolor* 由来酵素は天野エンザイム社製アロマーゼから各種クロマトグラフィーにより精製した。糖転移反応の速度論的解析においては，糖受容体として AA を用い，糖供与体として *p*NPG または cellobiose を用い，37℃で 30 分反応させた。*A. niger* 由来酵素の糖転移反応における *p*NPG に対する $K_m$ は 55.5 mM，cellobiose に対する $K_m$ は 24.3 mM であり，*p*NPG を用いた場合は基質阻害が観察され，$K_i$ は 5.71 mM であった。一方で，*P. multicolor* 由来酵素の糖転移反応における *p*NPG に対する $K_m$ は 7.47 mM，cellobiose に対する $K_m$ は 37.0 mM であり，*p*NPG を用いた場合は基質阻害が観察され，$K_i$ は 50.0 mM であった。これらのことから，AA への糖転移反応においても，*P. multicolor* 由来酵素が *A. niger* 由来酵素に比べて *p*NPG に対して高い親和性をもち，なおかつ cellobiose を用いた際の反応速度が遅いということが明らかとなった。このように，*P. multicolor* 由来酵素は *A. niger* 由来酵素と比べ，AA への糖転移反応における糖供与体として *p*NPG のような芳香族配糖体に対してより高い選択性を示す一方で，cellobiose に対してはより低い選択性を示すことが改めて支持された。
[1] 菅沼・寺坂・仁戸田・神崎，日本農芸化学会 2016 年度札幌大会要旨集，p. 74 (2016)

glycoside hydrolase, *Penicillium multicolor*, *Aspergillus niger*

発表責任者：神崎浩（hkanzaki@okayama-u.ac.jp）

講演番号：2J33p15
講演日時：3 月 18 日 17:50～ J 校舎 33 会場

*Ruminiclostridium josui* 由来のフェルラ酸エステラーゼ Fae1A の酵素特性と CBM の吸着特性の解析

Enzyme activity of ferulic acid esterase Fae1A derived from *Ruminiclostridium josui* and adsorption of its CBM

○間宮 愛、勝崎 裕隆、粟冠 真紀子、木村 哲哉、粟冠 和郎（三重大院生物資源）
○Ai MAMIYA, Hirotaka KATSUZAKI, Makiko SAKKA, Tetsuya KIMURA, Kazuo SAKKA (Mie Univ.)

【背景と目的】バイオマスの効率的分解において、セルラーゼやヘミセルロースの主鎖を加水分解するヘミセルラーゼに加え、側鎖を分解する酵素の存在が不可欠である。細菌や真菌類が持つフェルラ酸エステラーゼは、ヘミセルロース内に存在するフェルラ酸のエステル結合を加水分解し、他の細胞壁分解酵素の多糖類へのアクセスを増強すると言われている。一方、フェルラ酸には抗酸化作用があり、血圧降下、血糖値低下などの作用を有するため、生活習慣病の予防・改善への利用が期待される。本研究では、*Ruminiclostridium josui* 由来のフェルラ酸エステラーゼ Fae1A、Fae1A の触媒部位(Fae1A△CBM6) をそれぞれ発現・精製し、酵素特性を明らかにした。

【方法、結果および考察】*R. josui* の *fae1A* 遺伝子にコードされる酵素はシグナルペプチド配列を有し、触媒モジュール(CE1)、糖質結合モジュール(CBM6)、ドックリンモジュールから成るモジュラー酵素である。フェルラ酸エステラーゼの分類については幾つか報告されており、Fae1A は CE1、FEF9B あるいは Type E に分類される酵素である。また、Fae1A がもつ CBM6 は *Ruminiclostridium cellulolyticum* のβ-ガラクトシダーゼの CBM6 に高い相同性を示した。Fae1A の発現用プラスミド構築にはベクターとして pET-28a(+)△N-His を用い、シグナルペプチドを除いた *fae1A* 遺伝子領域を導入した。構築したプラスミドを大腸菌 BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL 株に導入し Fae1A を発現し、HisTrap カラムを用いて精製した。Fae1A はフェルラ酸メチル(26.6U/μmol-protein)、フェルラ酸エチル(15.7U/μmol-protein)、*p*-クマル酸エチル(13.4U/μmol-protein)、カフェ酸メチル(9.8U/μmol-protein)、シナピン酸メチル(18.1U/μmol-protein)などの合成基質に対して幅広い分解活性を示した。また、天然基質である稲わらや小麦ふすまを分解し、フェルラ酸や *p*-クマル酸などのヒドロキシケイ皮酸を遊離した。天然基質からのフェルラ酸の遊離量は、キシラナーゼの共存により増加した。さらに、Fae1A は天然基質を分解した時、フェルラ酸の二量体であるジフェルラ酸を遊離した。これらの性質は Type D の酵素に類似していた。また、Fae1A と Fae1A△CBM6 の可溶性多糖に対する結合性を Native affinity PAGE で調べたところ、Fae1A のみが可溶性小麦アラビノキシランに対して親和性を示したことから、Fae1A の CBM6 はアラビノキシランのアラビノースを認識していることが予想された。CBM6 の発現も試みており、その結果についても報告する予定である。

ferulic acid esterase, CBM, *Ruminiclostridium josui*

講演番号：2J33p16
講演日時：3 月 18 日 18:05～ J 校舎 33 会場

*Luteolibacter algae* H18 由来フコイダンデアセチラーゼの特性評価
Properties of fucoidan deacetylase of *Luteolibacter algae* H18
○長尾 達彦[1,2]、小松 史佳[1]、八木 寿梓[3]、鈴木 宏和[1]、大城 隆[1] ([1]鳥取大院・工、[2]深江化成株式会社、[3]鳥取大・工・GSC)
○Tatsuhiko NAGAO[1,2], Fumika KOMATSU[1], Hisashi YAGI[3], Hirokazu SUZUKI[1], Takashi OHSHIRO[1] ([1]Tottori Univ., [2]Fukaekasei Co., Ltd., [3]Tottori Univ. GSC)

【目的】
フコイダンは、褐藻類や棘皮類の粘質物に含まれ、主鎖であるフコースに硫酸基やウロン酸が結合したヘテロ硫酸化多糖の一種である。海藻由来のフコイダンの生理活性は、抗血液凝固作用や抗ウイルス作用、抗ガン作用など多岐にわたり、これらの性質を利用した医療や健康食品への応用が期待されている。しかしながら、褐藻の種類によってフコイダンの構造は大きく異なり、構造と生理活性との関連には不明な点が多いのが現状である。当研究室では、オキナワモズク（*Cladosiphon okamuranus*）由来フコイダンの生理活性機構の解明を目指して、酵素的な低分子化に取り組んでいる。すでに単離しているフコイダン分解菌 *Luteolibacter algae* H18 株は、フコイダン分解酵素を細胞内に有しており、H18 株の酵素によってフコイダンが低分子化される際、脱アセチル化反応が起こった後に低分子化反応が進むことが明らかになっている。そして、この脱アセチル化反応を触媒するフコイダンデアセチラーゼ遺伝子をクローニングし、大腸菌で発現させることができた。本研究では、H18 株のフコイダンデアセチラーゼの特性について、基質としてフコイダンおよび人工基質を用いて検討した。また、SWISS-MODEL により予測されたフコイダンデアセチラーゼの構造モデルについての検討を行った。

【方法・結果】
組み換え大腸菌から無細胞抽出液を調製し、Ni Sepharose 6 FF によって酵素精製を行った。得られた精製酵素を用いて、金属イオン、阻害剤の活性に対する影響を調べた。フコイダンを基質とした場合は、30℃、16 h 酵素反応を行った後、イオンクロマトグラフィーによって酢酸の濃度を測定した。一方、本酵素は高分子のフコイダン以外に、有機酸の *p*-nitrophenyl 誘導体にも作用することが明らかになり、その中では *p*-nitrophenyl acetate に対する反応性が最も高かった。基質がフコイダンと *p*-nitrophenyl acetate のいずれの場合も重金属類の添加により活性が低下した。しかしながら、フコイダンを基質とした場合は、SH 阻害剤による著しい活性阻害が見られたが、*p*-nitrophenyl acetate を基質とした場合は、SH 阻害剤による阻害が見られなかった。この結果から、本酵素が高分子化合物であるフコイダンを結合する際に SH 基が関与している可能性が考えられた。さらに、SWISS-MODEL によって、フコイダンデアセチラーゼの予測構造モデルを作成したところ、加水分解酵素に典型的な Ser238、Asp299、His329 が本酵素の触媒残基であることが予想された。

Fucoidan, deacetylase, esterase

講演番号：2J34a01
講演日時：3 月 18 日 09:20～ J 校舎 34 会場

ヒドラジン合成反応を触媒するマルチヘムタンパク質複合体の結晶構造
Crystal structure of multi-heme protein complex catalyzing hydrazine synthesis reaction
○北村 龍史[1]、平 大輔[1]、中村 照也[2]、山縣 ゆり子[2]、古川 憲治[3]、藤井 隆夫[1]([1]崇城大・応生命、[2]熊大・薬、[3]熊大院・自然科学)
○ Ryuji KITAMURA[1], Daisuke HIRA[1], Teruya NAKAMURA[2], Yuriko YAMAGATA[2], Kenji FURUKAWA[3], Takao FUJII[1] ([1]Life Sci., Sojo Univ., [2]Pharm. Sci., Kumamoto Univ., [3]Grad. Sch. Sci. Tech., Kumamoto Univ.)

【目的】嫌気性アンモニア酸化反応（anaerobic ammonium oxidation：anammox）では $NO_2^-$ と $NH_4^+$ から、全ての生物の代謝中間体として報告の無かった、ヒドラジン($N_2H_4$)が合成され、$N_2$ が生成される。$N_2H_4$ 合成はヘテロ 3 量体シトクロム $c$ であるヒドラジンシンターゼ(HZS)によって触媒されることが明らかにされている。しかし、HZS 単独での $N_2H_4$ 合成の分子活性値は 0.08 $min^{-1}$ と報告されており、酵素としては非常に低い値であった。一方我々は、HZS とともにヘテロ 2 量体シトクロム $c$ である NaxLS を共存させると、HZS の $N_2H_4$ 合成分子活性値が 15.4 $min^{-1}$ と大きく上昇することを見出した。このことから HZS と NaxLS がヒドラジン合成反応の際に複合体を形成しているのではないかと推定した。そこで本研究では $N_2H_4$ 合成のメカニズムの詳細を解明するため HZS と NaxLS の複合体の立体構造を明らかにし、ヒドラジン合成反応に対する NaxLS の役割を考察することを目的とした。
【方法】anammox 菌優先汚泥から精製した HZS と、大腸菌発現させた NaxLS を用いて、ハンギングドロップ蒸気拡散法により HZS-NaxLS 複合体結晶を調製した。得られた結晶を用いて SPring-8 BL41XU にて回折実験を行ない、既に構造が明らかになっている HZS 単独の構造データ(pdbID:5C2V)を鋳型に、分子置換法によって初期位相を決定し、立体構造を構築した。
【結果】HZS と NaxLS からなるヒドラジン合成酵素複合体の立体構造を決定した。HZS 部分は $\alpha\beta\gamma$ のヘテロ 3 量体を形成し、更にそれが 2 量化した $\alpha_2\beta_2\gamma_2$(6 量体)構造をとっていた。このうち $\alpha$ と $\gamma$ サブユニットそれぞれに、5 配位と 6 配位のヘムが一つずつ確認できた。この 5 配位のヘムが活性中心と考えられ、またこのヘム間および分子表面に伸びるトンネルが確認できた。このトンネルは HZS 単独の構造でも確認でき、おそらく基質を活性中心のヘムへと導くためのものであると考えられた。HZS 単独の構造と複合体中の HZS の構造で、トンネル内部の構造に大きな変化は見られなかった。一方、トンネル開口部において、HZS 単独の構造では構造決定できていなかった部分があり、複合体ではその構造を決定することができた。これは複合体形成によって HZS のトンネル開口部の構造ゆらぎが小さくなったためと考えられた。また複合体構造より、HZS と NaxLS の結合は電子伝達タンパク質にしては非常に強固であると推定され、実際に、溶液中で複合体を形成することが、プルダウンアッセイにより確認された。以上のことから、NaxLS はヒドラジン合成反応に対して、HZS と複合体を形成し、(1)HZS のトンネル開口部の構造安定化による基質の活性部位への誘導、(2)酸化還元に伴う電子伝達、あるいは(1)(2)の両方の効果による、$N_2H_4$ の合成の効率化に寄与していることがわかった。

anammox, hydrazine synthesis, crystal struture

発表責任者：平大輔（hira@life.sojo-u.ac.jp）

講演番号：2J34a02
講演日時：3 月 18 日 09:35～ J 校舎 34 会場

anammox 菌のヒドロキシルアミン酸化還元酵素とモノヘムシトクロム *c* の電子伝達反応
Electron transfer reaction of hydroxylamine oxidoreductase and mono-heme cytochrome *c* from an anammox bacterium

○平 大輔[1]、中村 照也[2]、山縣 ゆり子[2]、古川 憲治[3]、藤井 隆夫[1]（[1]崇城大応生命、[2]熊大院薬、[3]熊大院自然科学）
○Daisuke HIRA[1], Teruya NAKAMURA[2], Yuriko YAMAGATA[2], Kenji FURUKAWA[3], Takao FUJII[1]（[1]Fac. Appl. Life Sci., Sojo Univ., [2]Grad. Sch. Pharm. Sci., Kumamoto Univ., [3]Grad. Sch. Sci. Tech., Kumamoto Univ.）

【目的】ある種の細菌が行う、嫌気的にアンモニアを酸化する（anaerobic ammonium oxidation：anammox）反応が知られている。anammox 反応では、亜硝酸が酸化剤となり、アンモニアと亜硝酸の窒素原子由来の窒素ガスが嫌気的に生じる。この反応過程においてヒドラジンが中間体となることが明らかとなっているが、反応機構の全容解明には至っていない。我々は独自に集積した anammox 菌 KSU-1 株について、ヒドロキシルアミン酸化還元酵素（HAO）、ヒドラジン酸化酵素（HZO）、ヒドラジン合成酵素（HZS）の精製、性質の解明を進めてきた。HAO はヒドロキシルアミンを一酸化窒素へと酸化する反応を触媒し、HZO はヒドラジンを窒素分子へと酸化する反応を触媒する。これら反応で生じる電子は、HAO 及び HZO から電子受容体へと伝達されると考えられるが、anammox の電子伝達経路についてはほとんどわかっていない。本研究では、HAO とその電子受容体と推定されたモノヘムシトクロム *c*（遺伝子番号 *b428*）の電子伝達反応について、速度論的・構造生物学的解析を行った。
【方法】anammox 菌 KSU-1 株優占汚泥より HAO を各種クロマトグラフィにより精製した。同じ試料より精製・同定した低分子量モノヘムシトクロム *c* 遺伝子 b428 をプラスミド pET20 に挿入し、大腸菌 BL21(DE3)株で発現させた。発現させたシトクロム *c*（b428）を各種カラムクロマトグラフィにより精製した。精製した HAO から b428 への電子伝達反応について、ヒドロキシルアミンを基質とし、Fe(III)状態の b428 を電子受容体とした定常状態酵素反応測定を行った。さらに、蒸気拡散法により精製した b428 の単結晶を調製し、SPring-8 bl44XU にて X 線回折データ収集を行い、b428 の立体構造の解明を行った。HAO および b428 の立体構造をもとに両者のドッキングシミュレーションを行い、電子伝達反応複合体について考察した。
【結果】HAO と b428 は生理的に十分な速度で電子伝達を行うことが明らかとなった。b428 は電子伝達タンパク質に見られる典型的な構造及び、His/Met 配位したヘムを有していた。b428 の分子表面にはヘムが露出している領域がみられ、この領域で HAO と相互作用し電子伝達反応が起きると予測できた。この領域は疎水的なアミノ酸残基及び塩基性残基である LYS67 が位置しており、ドッキングシミュレーションよりこの残基が HAO との静電相互作用に重要であることが推定された。

anammox, heme protein, electron transfer

発表責任者：平大輔（hira@life.sojo-u.ac.jp）

講演番号：2J34a03
講演日時：3 月 18 日 09:50～ J 校舎 34 会場

*Ogataea polymorpha* NBRC 0799 株が産生する 2 つのカルボニル還元酵素の性質解明と大腸菌で発現させた組換え酵素を用いたトリフルオロアセトンの還元反応

Characterization of the two carbonyl reductases from *Ogataea polymorpha* NBRC 0799 and reduction reaction of 1,1,1-trifluoroacetone by using recombinant enzyme expression in *E. coli*

○三木 慎介[3]、七田 沙耶香[1,2]、奥 祐子[1,2]、松井 大亮[1,2]、礒部 公安[1,2]、西井 哲郎[3]、淺野 泰久[1,2] ([1]富山県大生工科・生工研セ、[2]JST, ERATO、[3]セントラル硝子(株))

○Shinsuke MIKI[3], Sayaka SHICHIDA[1,2], Yuko OKU[1,2], Daisuke MATSUI[1,2], Kimiyasu ISOBE[1,2], Tetsuro NISHII[3], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., Biotech. Res. Center & Dept. Biotech., [2]ERATO, JST, [3]Central Glass Co., Ltd.)

【目的】光学活性な含フッ素アルコール類は、医薬品や農薬などの合成原料として有用であり、その簡便な合成方法の開発が望まれている。これまでの研究によって、*Ogataea polymorpha* NBRC 0799 株が 1,1,1-トリフルオロアセトンを 1,1,1-トリフルオロ-2-プロパノールに還元することを見出し、本菌株が、この反応を触媒する 2 つの酵素 (*Op*ADH-1 と *Op*ADH-2) を産生していることを明らかにした。[1, 2] 本年度は、これらの基質特異性や反応動力学定数などについて詳しく検討し、両酵素の違いを明らかにした。また、大腸菌を用いた両酵素遺伝子の発現についても検討した。

【方法】各酵素を各種ｸﾛﾏﾄｸﾞﾗﾌｨｰにより精製し[2]、酵素反応は両酵素の最適条件で比較した。続いて、*O. polymorpha* NBRC 0799 株から DNA を抽出し、両酵素の遺伝子を PCR にて増幅した後、pET11a ベクターにクローニングした。そのプラスミドを導入して、大腸菌 BL21(DE3)株を形質転換し、30℃または 20℃で発現誘導を行った。組換え酵素を用いた 1,1,1-トリフルオロアセトンの 1,1,1-トリフルオロ-2-プロパノールへの還元は、菌体破砕して調製した粗酵素液を用いて測定し、生成物の光学純度はガスクロマトグラフィーの結果から求めた。

【結果・考察】両酵素は、いずれもアルコールよりもケトンやアルデヒドに対して高い活性を示し、カルボニル還元酵素に分類された (下記の *Op*CRD-1 と *Op*CRD-2 は、*Op*ADH-1 と *Op*ADH-2 に対応)。また両酵素ともフルオロアセトン類に対する活性は、フッ素置換数が多くなるほど低下する傾向があり、*Op*CRD-1 の 1,1,1-トリフルオロアセトンに対する $K_m$ 値は 68 mM、*Op*CRD-2 では 36 mM であった。

次に、大腸菌による *Op*CRD-1 と *Op*CRD-2 の遺伝子の発現を検討した結果、前者は 20℃、後者は 30℃が最適誘導温度であった。組換え酵素液を用いて生成物の光学純度を調べた結果、*Op*CRD-1 は (*R*)-1,1,1-トリフルオロ-2-プロパノールを 40%ee の光学純度で生成し、*Op*CRD-2 は(*S*)-1,1,1-トリフルオロ-2-プロパノールを 99%ee 以上の光学純度で生成した。以上の結果から、*O. polymorpha* NBRC 0799 が産生する *Op*CRD-2 は、(*S*)-1,1,1-トリフルオロ-2-プロパノールの製造に適していると考えられた。

【参考文献】

1) 上田量子他：日本農芸化学会 2015 年度大会要旨集、3C22a07
2) 七田沙耶香他：日本農芸化学会 2016 年度大会要旨集、3D041

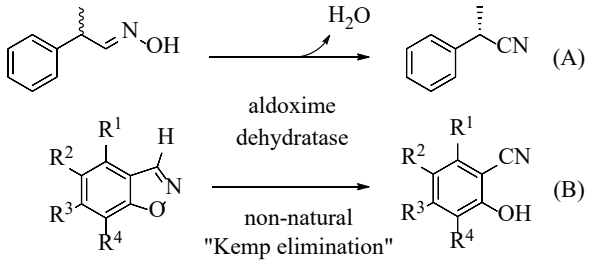
Alcohol dehydrogenase, Ogataea polymorpha, 1,1,1-Trifluoroacetone

講演番号：2J34a04
講演日時：3 月 18 日 10:05～ J 校舎 34 会場

# Application of aldoxime dehydratases (Oxd) in organic nitrile syntheses

○ Richard Metzner[1,2], Yufeng Miao[1,2], Akari Yagi[1], Alessa Hinzmann[3], Yasuhisa Asano[1,2]
([1]Biotechnology Research Center and Department of Biotechnology, Toyama Prefectural University, [2]Asano Active Enzyme Molecule Project, ERATO, JST, [3]Faculty of Chemistry, Organic Chemistry I, Bielefeld University)

Industrial production of bulk and fine chemicals requires more caution in view of hazardous chemicals and waste accumulation. Thus, the establishment of catalytic reactions with a high E-factor (kg product per kg waste) is an important goal. In favor of biocatalysis, water is not regarded as waste, which makes dehydration reactions the ideal candidates for this endeavor. This concept of generating valuable bulk chemicals *via* direct elimination of water was recently found for naturally abundant organic nitriles. The discovery of an "aldoxime-nitrile pathway" in *Bacillus* sp. OxB-1 by Asano and Kato enabled the first biocatalytic nitrile synthesis from another C-N bond, i.e. an aldoxime.[1] Aldoxime dehydratase is a redox-active iron(II) heme protein, which catalyzes the elimination of water without any by-products or cofactors. Thus, we investigated the potential use of this fascinating new lyase for the environmentally benign production of nitriles.




We discovered aldoxime dehydratases exhibiting enantioselectivity for 2-arylpropionaldoximes.[2] Although it is common for biocatalysts to have an enantiopreference, the complexity of diastereomeric chiral *E/Z*-aldoximes and a low thermodynamic barrier for *E/Z*-isomerization concealed this valuable property. By decreasing the free enthalpy of the biotransformation, the inherent isomerization was suppressed and an excellent enantioselectivity for the dehydration of *E*-aldoximes was identified, with up to 98% ee for the synthesis of (*S*)-2-phenylpropionitrile (A).[3] In addition, we could prove that aldoxime dehydratases exhibit promiscuous catalytic activity for similar C=N-O structure motifs, i.e. the non-natural Kemp elimination reaction in which a heteroaromatic 1,2-benzisoxazole is cleaved into the corresponding salicylonitrile (B). To discriminate whether this activity is base- or redox-catalyzed, we investigated different substitution patterns for the heteroaromatic substrate in correlation to the $C^3$-hydrogen p$K_a$ value and the electrochemical behavior of the aromatic N-O bond.

[1] Y. Asano, Y. Kato, *FEMS Microbiol. Lett*. **1998**, *158*, 185–190. [2] R. Metzner, S. Okazaki, Y. Asano, H. Gröger, *ChemCatChem* **2014**, *6*, 3105–3109. [3] Y. Miao, R. Metzner, Y. Asano, *ChemBioChem*, accepted.

Aldoxime dehydratase, Enzyme promiscuity, Nitrile synthesis

発表責任者：Yasuhisa Asano（asano@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：2J34a05
講演日時：3 月 18 日 10:20～ J 校舎 34 会場

# 不斉酸化反応を触媒する固定化蛍光菌 HasApf(SanCat-Super)

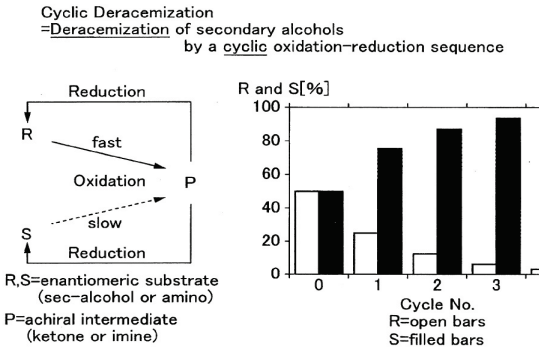
# Heterogeneous Immobilized Catalysis using Hemophore HasA for Asymmetric Oxidation

○永岡 宏行 (サンヨー食品開発)
○Hiroyuki NAGAOKA (Sanyo Foods Co. Ltd., R&D)

不斉酸化反応を触媒する蛍光菌 HasApf を大腸菌発現させ[1]、物理化学的手法（ESR）にて精査した結果、酸化型ヘム低スピン状態の信号 g ＝2.8, 2.22, 1.72 が酸素のヘム配位により消失する理由から、蛍光菌 HasApf がチトクローム P450 様の反応活性種にあることを突き止めた[2-4]。該蛍光菌 HasApf を更に、多孔質セラミック担体へ固定化でき、ワンポットデラセミ化による固定化生体触媒の可能性を見出した[5-6]。

反応活性種： $Fe^{II} + O_2 \rightarrow Fe^{III}\text{-}O\text{-}O^{-} \rightarrow Fe^{IV}=O$ (oxidizing *rac*-1) $\rightarrow Fe^{II} + H_2O$

蛍光菌 HasApf の多孔質セラミック担体（トヨナイト 200）への吸着固定化を試みた結果、担体 1 g に対して、凡そ 16mg（0.0016μM）の HasApf が吸着固定化でき、基質濃度 1.6mM に対して好適に作用することより、反応効率（Turnover）は凡そ $2 \times 10^6$、比活性は 0.74 ± 0.03 mU/(mg·min) にあることを導いた[6]。固定化 HasA（ImHApf）は、基質濃度 0.8mM 系にて、有機溶媒処理後も 4 回の連続再利用・$NaBH_4$ との組合せからのワンポットのデラセミ化反応が可能、NAD (P) 添加不要などの特徴から、低コスト反応・低環境負荷-固定化生体触媒として有機合成化学へ応用可と考察した。また、固定化 HasA は、通称 SanCat-Super として、現在、和光純薬工業(株)より販売されるに至っている（CodeNo. 350-42331、250mg)。




References
1) H. Nagaoka *et al*., *Biotechnol. Prog.* **2012**, *28*, 953-.
2) H. Nagaoka, *ACS Catal.* **2014**, *4*, 553-
3) H. Nagaoka, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 16333-
4) H. Nagaoka, *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 13384-.
5) H. Nagaoka, *Catalysts* **2016**, *6,* 38; doi:10.3390/catal6030038.
6) H. Nagaoka, *Biomolecules*, **2016**, *6*, 41; doi:10.3390/biom6040041.

Immobilized HasApf, Iron electron-transfer system, porous ceramic particle

発表責任者：永岡宏行（hnagaoka@sanyofoods.co.jp）

講演番号：2J34a06
講演日時：3 月 18 日 10:45～ J 校舎 34 会場

キノン補酵素生合成に関わる FAD 依存性モノオキシゲナーゼ QhpG の分光学的特性と基質タンパク質 QhpC との相互作用
FAD-dependent monooxygenase involved in quinone cofactor biosynthesis: spectroscopic properties and interaction with substrate protein QhpC
○大関 俊範、中井 忠志、谷澤 克行、岡島 俊英（大阪大学　産業科学研究所）
○Toshinori OOZEKI, Tadashi NAKAI, Katsuyuki TANIZAWA, Toshihide OKAJIMA (Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka Univ.)

キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素（QHNDH）は、グラム陰性細菌のペリプラズムにおいて一級アミン類の酸化的脱アミノ反応を触媒する。本酵素はヘテロ三量体構造から成り、最小のγサブユニット（QhpC）では、Trp 残基と Cys 残基より共有結合型キノン補酵素システイントリプトフィルキノン（CTQ）が形成され、Cys 残基と酸性アミノ酸残基の間には３ヶ所の分子内チオエーテル架橋構造が存在するなど極めてユニークな翻訳後修飾構造を有している。チオエーテル架橋構造は *qhp* オペロン内にコードされているラジカル SAM 酵素の QhpD によって形成されることが明らかになっているが、CTQ の生合成機構に関してはほとんど未解明に残されている。これまでに、遺伝子破壊実験の結果より同オペロン内の *qhp*G が QHNDH の生合成に必須であることが判明しているが、遺伝子産物 QhpG の具体的な役割は不明である。ホモロジー検索の結果から QhpG は FAD 依存性モノオキシゲナーゼと考えられ、CTQ 形成に必要な前駆体 Trp 残基側鎖の特異的な水酸化反応に関わるのではないかと推測される。本研究は、QHNDH 生合成における QhpG の役割を解明することを最終的な目的とし、まず QhpG を発現精製するとともに、その基質と予想されるチオエーテル架橋含有 QhpC を調製した。また、QhpC と QhpG との相互作用に関しても検討した。

*Pseudomonas putida* に由来する QhpG は、本酵素遺伝子を pET ベクター上にクローニングし、発現させた。精製された QhpG は酸化型 FAD と一致する可視吸収を示し、FAD 結合タンパク質であることを裏付けた。FAD はジチオン酸ナトリウムによって容易に還元され可視領域で無色となる一方、変性剤存在下において酵素タンパク質より解離したことから、その結合は非共有結合であることがわかった。次に、架橋 QhpC を調製した。まず、*Ps. putida* QhpC と QhpD と共発現し、複合体を嫌気下で反応させたが、3 ヶ所の架橋を含有する QhpC の生成はわずかであった。おそらく、*Ps. putida* QhpD の酸素に対する不安定性に起因すると考えられた。そこで、より安定な *Paracoccus denitrificans* QhpD と *Ps. putida* QhpC を共発現し架橋形成を試みた結果、異なる細菌種由来の組み合わせであるにもかかわらず、3 ヶ所の架橋を含有する QhpC の生成量を約 2.2 倍に増加させることができた。さらに得られた架橋 QhpC との相互作用を調べるため、QhpG と混合し Native PAGE を行なった。その結果、未架橋 QhpC は QhpG バンドの移動度に影響しなかったが、架橋形成した QhpC ではシフトさせることが判明した。すなわち、QhpG は架橋 QhpC のみと安定に複合体を形成できると考えられた。今後は、QhpG 試験管内反応系を構築し、CTQ 形成反応の詳細を解析する予定である。

FAD, quinone cofactor, monooxygenase

発表責任者：大関俊範（toshinori-oozeki44@sanken.osaka-u.ac.jp）

講演番号：2J34a07
講演日時：3 月 18 日 11:00～ J 校舎 34 会場

# ペルオキシレドキシン Q との相互作用を調節するシロイヌナズナ・チオレドキシンの重要なアミノ酸残基

Important amino acid residues of *A. thaliana* thioredoxins modulating their interactions with peroxiredoxin Q.

○手島 圭三、宇都宮 健、相川 瑞季、中川 直樹 (広大院・生物圏)
○Keizo TESHIMA, Takeru Utsunomiya, Mizuki Aikawa, Naoki Nakagawa (Grad. Sch. Biosphere Sci., Hiroshima Univ.)

【背景と目的】　高等植物では、光化学系 I 複合体からフェレドキシンを介して種々の経路へ還元力が分配される。その重要なものの 1 つにチオレドキシン（Trx）を経由する経路がある。葉緑体に存在する Trx ファミリーは明反応やカルビン回路の酵素を活性化し、光合成過程で生じた過酸化物を除去するペルオキシレドキシン（Prx）に還元力を供給する。我々は、*A. thaliana* Trx y2 と Prx Q の相互作用に重要な非共有結合的相互作用を明らかにし、それを足がかりに葉緑体 Trx ファミリーの標的蛋白質に対する特異性決定機構の全体像の解明に寄与したいと考えている。

【方法】Prx Q 還元測定 --- 大過剰 DTT → Trx → Prx Q → *t*-butyl hydroperoxide の反応系を用いて種々の Trx 濃度における Prx Q 還元速度を求め、Michaelis-Menten の式により解析した。

酸化還元電位の決定 --- AMS nonreducing SDS-PAGE 法と mBBr 蛍光測定法を用いて決定した。

【結果と考察】　*A. thaliana* Trx y2 の Prx Q 還元反応について、次のことを調べた。

（１） Trx y2 の活性部位アミノ酸残基の役割 --- 活性部位（WCGPC）の W、G、P をそれぞれ。F、A、T に改変した変異体の反応を調べたところ、P32T はほとんど活性がなくなり、W29F の $k_{cat}$ は野生型の約 1/2 になったが G31A の $k_{cat}$ は野生型と変わらなかった。活性のある W29F と G31A の $K_m$ は野生型と同じであった。G31A の酸化還元電位（$E^0$）は野生型と変わらず P32T と W29F は変動した。

（２） Trx y2 の活性部位周辺のイオン性アミノ酸残基の役割 --- Trx y2 と Prx Q の相互作用がイオン強度に依存したので、Trx y2 の活性部位周辺にあるイオン性残基で Trx m1 や Trx f1 では電荷をもたないか、y2 と反対の電荷をもつようになる 6 つの残基について、それぞれ電荷のないものに改変した Trx y2 変異体を調製した。これらの変異体の $E^0$ は野生型と変わらなかった。これらのうち K3Q と D57N の $K_m$ が野生型の約 2 倍になり、一方、E71Q の $k_{cat}$ が野生型の約 1/2 になった。

（３） Trx アイソフォームの y2 タイプ化 --- Trx m1 の Prx Q 還元反応の $K_m$ は y2 の約 6 倍、$k_{cat}$ は y2 の約 1/4 である。Trx y2 で変異により $K_m$ と $k_{cat}$ に変化がみられた残基の m1 の対応残基は P9、N64、R78 である。これらをそれぞれ y2 タイプ化した変異体の反応を調べたところ、P9K と N64D はどちらも $K_m$ は m1 野生型の約 1/2 になり、R78E の $k_{cat}$ は野生型の約 3 倍になった。

以上のことから、Trx y2 の K3 と D57 は Trx y2 と Prx Q の結合特異性に重要である。また、E71 は Trx y2 と Prx Q の複合体中での触媒反応（S-S 交換反応）に関与していることが示唆された。Prx Q は Trx と異なり DTT で還元されにくく、また、酸化型と還元型で活性部位の二次構造が変化すると報告されているので、Trx y2 と Prx Q の S-S 交換反応がどのように進行するのか興味深い。

thioredoxin, peroxiredoxin, *A. thaliana*

発表責任者：手島圭三（teshi@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：2J34a08
講演日時：3 月 18 日 11:15～ J 校舎 34 会場

*Shewanella* 属細菌由来シトクロム *c′* の安定性の比較研究
A comparative study on the stability of cytochrome *c′* from *Shewanella* spesies
○須賀 朝子[1]、加藤 雄基[2]、藤井 創太郎[2]、三本木 至宏[2] ([1]広島大生物生産、[2]広島大院生物圏)
○Asako Suka[1], Yuki Kato[2], Sotaro Fujii[2], Yoshihiro Sambongi[2] ([1]Hiroshima Univ., [2]Hiroshima Graduate School .)

【目的】*Shewanella* 属細菌は、高圧から常圧域、そして低温から常温域に生息している。本研究では、至適生育環境が 37℃、0.1 MPa である *Shewanella amazonensis* に由来するシトクロム *c′* (SACP) 、20℃、0.1 MPa である *Shewanalla livingstonensis* のシトクロム *c′*(SLCP) 、8℃、30 MPa である *Shewanella violacea* のシトクロム *c′* (SVCP)、そして 10℃、50 MPa である *Shewanella benthica* のシトクロム *c′*(SBCP)を用いて菌の生育圧力と生育温度が、タンパク質の安定性にどのように関係しているかを調べた。シトクロム *c′* は、4 本のαヘリックスが束になった 4-helix bundle であり、多くはダイマーとして存在する。同様の 4 種の *Shewanella* 属細菌由来のモノマータンパク質であるシトクロム $c_5$ については、好圧性の *S. benthica* および *S. violacea* 由来のものが、圧力感受性の *S. amazonensis* および *S. livingstonensis* 由来のシトクロム $c_5$ よりも安定性が高いということが分かっている。すなわち、シトクロム $c_5$ の安定性は由来する菌の生育圧力に相関している。本研究では、ダイマータンパク質であるシトクロム *c′* がどのような安定性を示すのか、そして異なる菌の生育環境下でのタンパク質の安定化機構についての知見を得る。

【方法・結果】SACP、SLCP、SVCP、及び SBCP 遺伝子を大腸菌コドンに適合させて合成し、大腸菌で異種発現させた。それぞれのシトクロム *c′* は各種カラムにより、SDS-PAGE でバンドが一本になるまで精製した。CD スペクトル測定の結果、αヘリックスを持つタンパク質に特徴的なピークである 208nm および 222nm に負のピークを持つことがわかった。そして、温度変化による 222nm の負のピークの値を追うことによって熱安定性を測定した。その結果、SACP の変性温度は 63.6℃、SLCP では 51.8℃、SVCP では 46.5℃となった。SWISS-MODEL による 3D シミュレーションとアミノ酸配列比較の結果、安定性の低い SLCP、SVCP の Lys 85、Asp 78 が安定性の高い SACP では Arg 85、Asn 78 であることにより水素結合ネットワークが形成することが分かった。また SVCP の His 22 が、SACP、SLCP では Tyr 22 であることによりダイマー間での水素結合の数が SACP、SLCP で増加することで安定化することを見出した。以上の結果から、シトクロム $c_5$ と異なり、シトクロム *c′* では安定性は生育圧力と相関せず生育温度とは相関することが明らかになった。本発表では併せて SBCP の熱安定性測定の結果についても報告する。

cytochrome *c′*, *shewanella*, stability

発表責任者：須賀朝子（b135721@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：2J34a09
講演日時：3 月 18 日 11:30～ J 校舎 34 会場

# *Aspergillus aculeatus* 由来 FAD 型グルコースデヒドロゲナーゼ AaGDHb の機能解析

# Functional analysis of FAD-dependent glucose dehydrogenase AaGDHb from *Aspergillus aculeatus*

○岡 修司、谷 修治、炭谷 順一、川口 剛司（阪府大院生還）
○Shuji OKA, Shuji Tani, Jun-ichi Sumitani, Takashi Kawaguchi (Osaka Pref. Univ.)

【目的】

自己血糖値測定に使用される酵素センサに応用可能な酵素として FAD 型グルコースデヒドロゲナーゼ（FAD-GDH）が注目されている。FAD-GDH は数種の *Aspergillus* 属において菌体外酵素として生産されることが報告されている。しかし、自己血糖値測定用酵素として応用する際に *Aspergillus* 属の FAD-GDH はキシロースに対しても反応性を示すことが問題点として挙げられている。そのためグルコースに対する特異性の高い FAD-GDH が求められている。我々は *Aspergillus aculeatus* においてゲノム情報から FAD-GDH 遺伝子と相同性の高い二つのホモログ遺伝子（*gdha*, *gdhb*）が存在していることを見いだした。すでに X 線結晶構造解析によって立体構造が明らかになっている *A. flavus* 由来の FAD-GDH（AfGDH）の構造を基に AaGDHa 及び AaGDHb のモデル構造を構築したところ、グルコースの 6 位のヒドロキシ基周辺の残基が他の *Aspergillus* 属の FAD-GDH と異なっており、キシロースに対する反応性が異なることが期待された。*gdha* については既に *A. oryzae* を宿主として発現させ、AaGDHa の酵素学的な機能解析を行っており、Kinetics 解析の結果から他の *Aspergillus* 属の FAD-GDH に比べて、キシロースの相対活性が低いことが示唆された。今回は *gdhb* について *Pichia pastoris* を宿主として発現させ、発現産物の酵素学的性質を検討することを目的とした。

【方法及び結果】

*A. aculeatus* のゲノムから *gdhb* を取得し、推定されるシグナル配列、イントロンを除去した領域を PCR により増幅した。得られた遺伝子を酵母発現ベクターpPIC9K に挿入し、*Sal*I を用いて断片化後、エレクトロポレーション法により *P. pastoris* GS115 株を形質転換した。得られた形質転換体を 24 時間ごとにメタノールを添加し誘導をかけ、30℃で 3 日間培養した。培養上清を用いて活性測定を行った結果、グルコースデヒドロゲナーゼ活性を有していることを確認した。2 L の培養液から硫安沈殿、BUTYL TOYOPEARL を用いた疎水クロマトによって精製標品を取得し、酵素学的性質を検討した。Kinetics 解析の結果からキシロースに対する相対活性が AfGDH よりも低いことが明らかとなった。AaGDHa 及び AaGDHb 両方のキシロースに対する相対活性の結果からグルコースの 6 位のヒドロキシ基周辺の残基がキシロースに対する相対活性に極めて重要であることが示唆された。

*Aspergillus aculeatus*, Fad dependent glucose dehydrogenase

講演番号：2J34a10
講演日時：3 月 18 日 11:45～ J 校舎 34 会場

Thermophilic bacteria are potential sources of novel Rieske non-heme iron oxygenases
○Joydeep CHAKRABORTY, Chiho SUZUKI-MINAKUCHI, Kazunori OKADA, Hideaki NOJIRI
(The Univ. of Tokyo)

**Objectives:** Rieske non-heme iron oxygenases (ROs) bearing Rieske-type [2Fe-2S] cluster and a non-heme catalytic iron center constitute a large family of oxidoreductases, which have potential utility in bioremediation of diverse aromatic compounds in the environment and are also involved in biosynthesis of several important bioactive natural products. However, ROs have widely been studied and characterized from mesophilic bacteria, mostly belonging to phyla proteobacteria and actinobacteria[1]. In contrast, very little is known about RO homologues present in bacteria surviving in extreme environments. In recent years, microbial genome sequencing projects have crowded public databases, which represent a huge pool of resources for future industrial catalysts. The present research aims at identifying and exploring the potential of novel ROs present in genomes of thermophilic bacteria either with known genome sequence or those freshly isolated from hot springs.
**Methods and Results:** Blast search performed against all thermophilic genomes using suitable query probes initially led to the identification of 95 putative homologs of the large (α) subunit of RO terminal oxygenase ($RO_{ox}$) distributed among 20 different genera. Among them, 44 non-redundant (NR) homologs were distributed mainly among Chloroflexi, Deinococcus-Thermus and Firmicutes. Thermostability, measured according to the aliphatic index, showed higher values for certain homologs compared with their mesophilic relatives. Prediction of substrate preferences using the RHObase[2] server indicated that a wide array of aromatic hydrocarbons could be transformed by most of the identified oxygenase homologs. Based on these analyses, two different strains, viz. *Thermus oshimai* JL-2 and *Geobacillus thermoglucosidasius* NBRC 107763 were finally selected for experimental studies. Identification of all possible constituent electron transport components (ETCs) within the genome was done using CDD and RHObase. Apart from a single copy of genes encoding the putative terminal oxygenase components (α and β subunits) in both the strains, two possible ferredoxins and four possible reductases were identified in strain JL-2 while a single ferredoxin and three possible reductases were identified in strain NBRC 107763, based on similarity with ETCs known to be associated with well-studied RO systems. All possible combinations of terminal oxygenase and ET components were selected from both organisms to reconstitute functional RO systems by cloning them in suitable vectors. Substrate transformation assay with the induced enzymes are underway to understand the catabolic potential and substrate preferences of the thermophilic RO homologues.
**Conclusions:** Apart from enriching our understanding on the distribution and mechanism of ROs in nature, this study is believed to aid in designing new bioremediation strategies along with application in industrial biosynthetic processes.

1. Chakraborty J, Ghosal D, Dutta A and Dutta TK (2012). *J. Biomol. Struct. Dyn.* 30: 419-436.
2. Chakraborty J, Jana T, Saha S and Dutta TK (2014). *Environ. Microbiol. Rep.* 6: 519-523.

Rieske [2Fe-2S] oxygenase, enzyme evolution, thermophile

発表責任者：NOJIRI Hideaki（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2J34p01
講演日時：3 月 18 日 14:00～ J 校舎 34 会場

*Geobacter sulfurreducens* が有するマルチヘム含有セレンタンパク質の精製と機能解析
Purification and characterization of a unique multiheme-containing selenoprotein from *Geobacter sulfurreducens*

○戸部 隆太、神農 美希、嶌本 奈々、三原 久明（立命大生命）
○Ryuta TOBE, Miki JINNO, Nana SHIMAMOTO, Hisaaki MIHARA (Ritsumeikan Univ.)

【背景】　グラム陰性の偏性嫌気性金属還元細菌 *Geobacter sulfurreducens* は、ゲノム上に 111 種の *c* 型シトクロム（Cyt *c*）様タンパク質及び 10 種のセレノシステイン（Sec）含有タンパク質（セレンタンパク質）遺伝子を有する。当研究室では、本菌がサブユニット当たり 5 つのヘムと 1 つの Sec をもつ新奇 Cyt *c* 様セレンタンパク質 MHSEP（MultiHeme-containing SElenoProtein）を有することを既に見出した。しかし、セレンタンパク質はその特殊性から異種発現系の構築や精製が困難なことから、MHSEP の機能は未だ明らかにされていない。これまでに、*mhsep* 欠損株を用いた解析により、本タンパク質が亜テルル酸及び亜セレン酸への電子伝達に関与していることが示唆されている。そこで、本研究では、MHSEP の分子機能を解明することを目的とし、本菌を宿主とする MHSEP 発現系を構築し、精製した MHSEP の諸性質を解析した。

【方法・結果】　MHSEP の機能を推定するために、MHSEP のアミノ酸配列を基に、BLASTP 検索およびモチーフ検索を行なった。その結果、MHSEP の類似タンパク質は *Geobacter* 属と一部の脱硫黄細菌にのみ存在するユニークなタンパク質であり、N 末端ドメインに硝酸還元酵素及び亜硝酸還元酵素と類似のモチーフを持つことが分かった。また、MHSEP の分子機能を解析するために、本タンパク質のリコンビナント発現系の構築とその精製を試みた。*mhsep* 遺伝子に Strep-tag を付加した遺伝子断片を pMMB206 に連結し、*G. sulfurreducens* を宿主とする *mhsep* 発現プラスミドを作製した。本プラスミドを *mhsep* 欠損株に導入した *mhsep* 発現株を用いて、Strep-tag 融合タンパク質として MHSEP の精製に成功した。本精製タンパク質の酸化還元スペクトルを測定した結果、還元型 *c* 型シトクロムに特徴的な α（553 nm）、β（524 nm）および γ（420 nm）のピークが検出され、本精製タンパク質がヘムを保持していることが示された。次に、本精製 MHSEP が酵素として機能するかについて検討した。これまでの知見から、基質になる可能性のある亜テルル酸、亜セレン酸、硝酸、亜硝酸、硫酸、亜硫酸、セレン酸をそれぞれ基質としてこれらの還元活性測定を行なった。その結果、亜セレン酸を基質とした場合に高い活性が認められ、本酵素はこれまで報告の無い新奇なセレンタンパク質型亜セレン酸還元酵素であることが示唆された。

Selenoprotein, Geobacter, Selenite reductase

発表責任者：三原久明（mihara@fc.ritsumei.ac.jp）

講演番号：2J34p02
講演日時：3 月 18 日 14:15～ J 校舎 34 会場

*In vitro* and *in vivo* analyses of a putative outer membrane channel protein, GSU2939, of the metal-reducing bacterium *Geobacter sulfurreducens*

○ Mst. Ishrat JAHAN[1], Ryota TOBE[1], Jun KAWAMOTO[2], Tatsuo KURIHARA[2], Hisaaki MIHARA[1] ([1]Ritsumeikan Univ., [2]Kyoto Univ.)

**【Introduction】**

Porins are outer membrane channel proteins transporting various molecules and maintaining the structural integrity of bacterial cells. A putative outer membrane channel protein, GSU2939, was found in a metal reducing bacterium, *Geobacter sulfurreducens*. The *gsu2939* gene is part of an operon together with 10 other genes including the multi-heme containing selenoprotein gene, but the function of GSU2939 is still unknown. Based on BLASTP analyses, close homologs of GSU2939 were only found within the family Geobacteraceae. Nevertheless, GSU2939 showed only less than 20% homology with phosphate selective porins of the porin P and porin O family, suggesting that GSU2939 is a novel type of porin with a specific function. Herein, we investigated the function of the novel outer membrane protein GSU2939.

**【Results and Discussion】**

An analysis of the intracellular localization of GSU2939 in *G. sulfurreducens* using anti-GSU2939 antibody showed that the majority of the protein with a molecular mass of about 45 kDa was detected in the outer membrane fraction. *In situ* proteinase K treatment of intact cells of *G. sulfurreducens* demonstrated no complete digestion of GSU2939, while outer membrane integrity was affected by proteinase K. These results are consistent with that GSU2939 is an outer membrane channel protein like porin. Investigation on the expression levels of GSU2939 at different growth phases in the wild-type cells showed that GSU2939 is log-phase specific porin. We also found that the expression of GSU2939 was neither affected by phosphate-starving conditions nor osmotic-stressed conditions, unlike typical porins. To further investigate the function of GSU2939, we prepared a *gsu2939*-deficient mutant. The *gsu2939*-deficient mutant showed a slower growth phenotype and lower metal-reducing ability compared with the wild type in the presence of ferric citrate, selenite, or tellurite as an electron acceptor, suggesting that GSU2939 participates in metal reduction. Because no significant antibiotic-transport activity was observed for GSU2939 both *in vitro* and *in vivo*, the protein may not function as a typical outer membrane channel. Rather, it is probably involved in a porin-cytochrome protein complex responsible for trans-outer membrane electron transfer during extracellular reduction of ferric citrate, selenite, and tellurite.

selenium, *Geobacter*, electron transfer

発表責任者：Hisaaki Mihara（mihara@fc.ritsumei.ac.jp）

講演番号：2J34p03
講演日時：3 月 18 日 14:30～ J 校舎 34 会場

# 大腸菌を宿主とする *Myrothecium verrucaria* 由来ビリルビンオキシダーゼの高活性発現系

# Functional expression in *Escherichia coli* of bilirubin oxidase from *Myrothecium verrucaria*

○野路 晴菜、新保 宏樹、櫻井 武、片岡 邦重（金沢大院自然科学）
○Haruna NOJI, Hiroki SHINBO, Takeshi SAKURAI, Kunishige KATAOKA (Kanazawa Univ.)

【背景と目的】糸状菌 *Myrothecium verrucaria* 由来のビリルビン酸化酵素（BOD）は，ヘムの代謝産物で黄疸の原因となるビリルビンを特異的に酸化できるため臨床検査用酵素として応用されている。BOD はマルチ銅オキシダーゼの一種で，分子内に活性に必須で分光学的・磁気的性質の異なる 3 種，計 4 つの銅，タイプⅠ銅（T1Cu），タイプⅡ銅及び複核タイプⅢ銅を持つ。基質の酸化と共役して，分子状酸素を水にまで 4 電子還元できるため，バイオ電池のカソード電極触媒としての応用が期待されている。我々は，酵母 *Pichia pastoris* を宿主とする BOD 発現系を用いて研究を行っているが，*Pichia* 系では相同組換えによる高発現株の取得及び培養・発現に時間を要し，原核生物を宿主とする発現系に比べ扱いにくい。そこで本研究では，取り扱いが容易で，さらに，糖鎖を付加しないため構造解析に有利な大腸菌を宿主とする高活性な BOD 発現系の構築を行った。

【方法及び結果・考察】PCR 法を用いて成熟 BOD をコードする遺伝子の 3’末端に 6xHis タグコード配列を付加した DNA 断片を調整し，T7 プロモーター制御下に挿入した BOD 発現プラスミド pUTBO を作製した。このプラスミドで大腸菌 BL21(DE3)株を形質転換し，TB 培地を用いて対数増殖期中期まで 37℃で振盪培養後，IPTG 及び塩化銅(Ⅱ)を加え 20℃で 16 時間静置培養を行った。菌体を超音波破砕し，その無細胞抽出液から Ni アフィニティー，陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて組換え型酵素を精製した。酵母発現型 BOD は二箇所の N 結合型糖鎖を持ち，その分子量が 66 kDa であるのに対し，大腸菌発現型酵素は，SDS-PAGE において糖鎖付加のない BOD の推定分子量約 62 kDa と一致するバンドを与えた。大腸菌発現型 BOD は，UV-Vis スペクトルにおいて T1Cu に由来する 600 nm の吸収が観測されたがその強度が低かった。そこで，強力な酸化剤である Ir(Ⅳ)塩を用いて T1Cu を酸化したところ，600 nm の吸収強度が約 2 倍に増大したことから，大腸菌発現型 BOD の T1Cu は約 50%が還元状態であると示唆された。また，Ir 酸化後も 600 nm 吸収強度は酵母発現型酵素の約 80%であることから大腸菌発現型 BOD の T1Cu 含量は低いと示唆された。大腸菌発現型酵素の EPR スペクトルは酵母発現型酵素のスペクトルと一致し， T1Cu のパラメーターは $g_{//}$ = 2.21，$A_{//}$ = 8.36 x $10^{-3}$ $cm^{-1}$，T2Cu のパラメーターは $g_{//}$ = 2.25，$A_{//}$ = 19.3 x $1010^{-3}$ $cm^{-1}$ であった。大腸菌発現型 BOD の ABTS に対する酸化活性は 70 U/mg であり，酵母発現型酵素の 94 U/mg より低い値であるが，銅含量を考慮すると両者は同等の活性を有していると考えられる。現在，銅含量の増大を目的として嫌気培養の検討を行っており，合わせて報告する予定である。

bilirubin oxidase, multicopper oxidase, heterologous expression

講演番号：2J34p04
講演日時：3 月 18 日 14:45～ J 校舎 34 会場

ビリルビンオキシダーゼのタイプ I 銅部位に存在する Trp396-His398 間共有結合の役割
Roles of the Trp396-His398 cross-linkage formed in the type I copper center in bilirubin oxidase
○片岡 邦重、奥田 葉子、野路 晴菜、櫻井 武（金沢大院自然科学）
○Kunishige KATAOKA, Yoko OKUDA, Haruna NOJI, Takeshi SAKURAI (Kanazawa Univ.)

【背景と目的】ヘムの分解物で黄疸の原因であるビリルビンを特異的に酸化できるため，臨床検査用酵素として利用されている糸状菌 *Myrothecium verrucaria* 由来のビリルビンオキシダーゼ（BOD）は，分子内に活性に不可欠な 4 つの銅イオンを持つマルチ銅オキシダーゼ（MCO）の一種である。基質の酸化により得た電子は，電子受容部位のタイプ I 銅（T1Cu）を経由して，タイプⅡ銅，複核タイプⅢ銅からなる三核銅部位に輸送され, ここで分子状酸素を 2 分子の水へ 4 電子還元する反応に使われる。これまでに我々は，T1Cu 電位が MCO の酵素活性を制御することを明らかにしている。BOD の T1Cu 部位は, 配位残基である His398 の N3 原子が, 近傍の Trp396 のインドール環 C2 原子と共有結合する，他の MCO では見られない特異な構造を取ることが明らかになった。そこで本研究では，Trp396 を標的とする部位特異的変異導入と化学修飾を行い，この翻訳後修飾による特異な構造が，BOD の T1Cu 電位と酵素活性に及ぼす影響を検討した。
【方法と結果・考察】酵母 *Pichia pastoris* を宿主とする発現系を用いて Trp396 を Ala, Thr, Tyr に置換した変異型酵素，W396A, W396T, W396Y を調製し，それぞれを均一に精製した。3 種の変異体は一部銅含量が低下したが, UV-Vis スペクトル及び CD スペクトルがいずれも野生型酵素と同様であることから， T1Cu 部位に変異による大きな構造変化はないと考えられる。また，EPR スペクトルにおいても変異の影響がないことが明らかになった。しかしながら，各変異体の T1Cu 酸化還元電位は野生型酵素より約 100 mV 負側にシフトし，Bilirubin, ABTS などの基質に対する酵素活性が著しく低下した。次に, Trp 特異的化学修飾試薬である *N*-Bromosuccinimide を野生型 BOD と反応させたところ, 量・時間依存的な失活が観察され，反応後の酵素の T1Cu 電位が負側にシフトした。これに対し，W396A 変異体では失活が起こりにくく，T1Cu 電位のシフトが見られなかった。さらにクロロホルムの存在下，280 nm の紫外線で Trp 残基を励起し反応させる Trp 特異的光ホルミル化反応においても野生型酵素は同様の失活が見られ，W396A 変異体では失活が起こりにくかった。一方我々は，T1Cu 軸位の配位残基である Met467 を Gln に置換することで T1Cu 電位が大きく負側にシフトし活性が激減した変異体では，この共有結合が形成されていないことを構造解析により最近明らかにした。これらの結果は，Trp396-His394 間の翻訳後修飾による共有結合構造が，BOD の T1Cu 酸化還元電位と酵素活性を制御していることを強く示唆している。

bilirubin oxidase, multicopper oxiidase, post-translational modification

講演番号：2J34p05
講演日時：3 月 18 日 15:00～ J 校舎 34 会場

超好熱アーキア *Pyrobaculum aerophilum* 由来変異型マルチ銅オキシダーゼの機能解析
Characterization of multicopper oxidase variant from *Pyrobaculum aerophilum*

○稲垣 康平[1]、里村 武範[1,2]、櫻庭 春彦[3]、大島 敏久[4]、末 信一朗[1,2]（[1]福井大院工、[2]福井大ライフ、[3]香川大農、[4]大阪工大工）
○Kohei INAGAKI[1], Takenori SATOMURA[1,2], Haruhiko SAKURABA[3], Toshihisa OHSHIMA[4], Shin-ichiro SUYE[1,2] ([1]Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [2]Res. Edu. Prog. Life Sci., Univ, Fukui, [3]Fac. Agric., Kagawa Univ., [4]Osaka Inst. Tech)

［諸言］

マルチ銅オキシダーゼ（MCO）は基質を酸化して余った電子によって酸素分子を水へと 4 電子還元する反応を触媒する一群の酵素である。一般的に MCO はフェノール類など様々な化合物を酸化することができることや、酸素分子を 4 電子還元して水を生成できることから、環境浄化用素子やバイオ電池用カソード素子として期待されている。我々は超好熱アーキア *Pyrobaculum aerophilum* から MCO（McoP）を見出すことに成功し、酵素の立体構造を含む詳細な機能解析に成功している[1)]。本酵素は高温、広範囲な pH 領域に対して高い安定性を示し応用利用に有用であることが明らかとなっている。しかしながら、本酵素はこれまで見出されている MCO に比べて活性が低いことから応用利用の律速となっている。そこで分子進化工学的手法によって本酵素の機能改変を行った。その結果、野生型 McoP よりも 5 倍高い比活性を示す変異型 McoP を見出すことに成功した。本研究では、この変異型 McoP の高触媒機構の解明を目的に研究を行った。

［方法・結果］

高い触媒活性を示した変異型 McoP の一次構造を解析した結果、4 つのアミノ酸が置換されていることが明らかとなった。この変異型 McoP の詳細な酵素化学的性質を解析したところ、基質である 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)に対する $K_m$ 値が野生型 McoP と比較して 3 倍減少しており基質親和性が上昇していた。また、至適温度が野生型 McoP と比較して約 10˚C 下がっていた。一方、至適 pH と pH 安定性、熱安定性に関しては野生型酵素と変わっていなかった。さらに、本変異酵素の詳細な解析を行うために 4 つのアミノ酸置換のうち単一のアミノ酸置換を導入した単一変異型 McoP を構築し、それぞれの変異酵素の性質の解析を行った。その結果、1 つの単一変異型 McoP において野生型 McoP よりも高い比活性が観察された。現在、この単一変異型 McoP のタンパク質構造解析を進めている。

1）H.Sakuraba *et al*., *Acta Crystallographica section F67*, 753-757（2011）

multicopper oxidase, hyperthermophilic archeae, directed evolution

講演番号：2J34p06
講演日時：3 月 18 日 15:25～ J 校舎 34 会場

# コファクター欠損変異体からみるフルクトース脱水素酵素の直接電子移動

# Studies on direct electron transfer of fructose dehydrogenase using deletion one of three hemes *c*

○日比野 佑哉、河井 翔太、北隅 優希、白井 理、加納 健司 (京大院農)
○Yuya Hibino, Shota Kawai, Yuki Kitazumi, Osamu Shirai, Kenji Kano (Kyoto Univ.)

【目的】

酸化還元酵素反応と電極反応は共役させることが可能であり，これをバイオエレクトロカタリシスと呼ぶ．これは，バイオ電池やバイオセンサのような生物電気化学デバイスに応用できる．とりわけ電極を一方の基質とみなす直接電子移動(DET)型反応は，最もシンプルなバイオエレクトロカタリシス系として，次世代バイオデバイス構築という応用研究も含め，世界的に注目されている．しかし，DET 型反応の詳細なメカニズムは不明である．

酢酸菌由来の膜結合型酵素であるフルクトース脱水素酵素(FDH)は DET 型触媒活性を持ち，その触媒電流密度が非常に高い．本研究は，FDH をモデルとした DET 型反応メカニズムの解明を目的としている．FDH は触媒活性中心である FAD と，3 つのヘム *c* を有している．先行研究より，3 つのヘム *c* のうち遺伝子配列上でもっとも上流に位置するものは DET 型触媒サイクルに関与せず，真ん中に位置するものが電極と直接電子移動していると推測した[(1)]．そこで，これを確かめるために，2 通りの方法で FDH から最上流のヘム *c* を欠損させた変異体の発現と特性評価を行った．

【結果・考察】

構築済みの FDH 発現プラスミドを改変し，最上流のヘム *c* と共有結合する 2 つの Cys を Ala に置換した変異体と，最上流のヘム *c* の共有結合サイトを含む配列を除去した変異体の発現系を構築した．両変異体は高いフルクトース酸化活性を有しており，安定性も保持していた．前者は DET 型触媒活性を有していることも確認できており，その電流–電圧曲線は FDH とほぼ同様であった．この結果は，遺伝子配列上で最上流に位置するヘム *c* が DET 型触媒サイクルに関与していないことを強く裏付けるものである．

また，DET 型反応は反応中心と電極との距離が近いほど反応効率が高くなると考えられている．後者の変異は，DET 型触媒サイクルに関与しない部分を欠損させることで，反応中心がより酵素表面に露出し，反応中心–電極間距離を大きく縮め，DET 型反応効率を高める可能性がある．今後は後者の変異体について精製条件を検討し，電気化学的に特性評価することで，変異が DET 型反応に及ぼす影響について考察する予定である．

(1)Y. Hibino, et al. *Electrochem. Commun.*, 2016, **67**, 43

direct electron transfer, fructose dehydrogenase, hemoprotein

発表責任者：日比野　佑哉（hibino.yuya.34r@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2J34p07
講演日時：3 月 18 日 15:40～ J 校舎 34 会場

糖鎖除去したラッカーゼの発現系の構築と性質
Heterogeneous expression of deglycosylated laccase from *Trametes versicolor* and its enzymetic properties

○山根 祥平[1]、野﨑 功一[1]、干川 康人[2]、今井 雄大[2]、多和田 華子[2]、京谷 隆[2]、伊藤 徹二[3]([1]信州大院・理工、[2]東北大・多元物質科学研、[3]産総研)
○Shohei Yamane[1], Kouichi Nozaki[1], Yasuto Hoshikawa[2], Takehiro Imai[2], Hanako Tawata[2], Takashi Kyotani[2], Testuji Ito[3] ([1]Grad.School of shinshu Univ., [2]IMRAM, [3]AIST)

［背景・目的］ 高出力なバイオ燃料電池を開発するには、電極における酵素の反応性を向上させる必要がある。そのためには、酵素の活性部位近傍を選択的に電極に結合させる配向制御が重要となる。そして、配向制御を実現するためには酵素の活性部位近傍の表面構造に対する知見を深める必要があると考える。そこで、本研究では電極用酵素として *Trametes versicolor* 由来ラッカーゼ 1（TvLcc）を用い、活性部位近傍に存在する糖鎖を除去し、その改変が電極に使用することにおいて重要な要素である酵素活性や安定性に対してどのような影響を及ぼすのかを調査する。そのために、*Aspergillus oryzae* による TvLcc の発現系を構築し、さらに発現に最適な培養条件を検討した。

［方法］ *A. oryzae* による TvLcc の発現系構築 本研究では、すでに結晶構造解析が完了していて、その表面構造が明らかにされている TvLcc（PDB ID:1GYC）と同じアミノ酸配列をコードし、コドンを最適化した人工合成 DNA を使用した。変異導入に関しては、電子受容部位近傍に存在し、酵素の電極への結合を妨げていることが予想される N 型糖鎖を除去するために、Asn332 と Asn340 をそれぞれ Asp に変異させたもの（N332D、N340D）を作製した。各 DNA 断片を麹菌発現用ベクターpNAN8142 に連結し、*A. oryzae* の形質転換を行った。

*A. oryzae* の培養条件の改良 この実験では TvLcc を発現する形質転換体を用いた。ラッカーゼの発現は、硫酸銅の添加時期と培養温度を変化させ、最適な条件を決定した。また、ラッカーゼの発現は ABTS による活性測定と Native-PAGE 後の活性染色で確認した。

［結果･考察］ 形質転換したコロニーを 0.1 mM の硫酸銅を含む SYP 培地にて 30℃で 8 日間培養した。その結果、活性は培養 5 日目に最大となり 70 U/L だった。次に、硫酸銅を添加する時期を培養 3 日目に変更したところ、活性の最大値は 8 日目に出現し 1.3 倍に増加した。加えて、培養温度を 3 日目から 25℃に変更すると、活性の最大値は 8 日目に 130 U/L に達し、最初の 1.8 倍に増加した。最適条件で N332D と N340D の形質転換体を培養し、活性染色を行った結果、これらの変異酵素は TvLcc と比較してバンドの位置がシフトした。このことから、変異導入によって酵素の性質が変化したものと予想した。現在は各ラッカーゼを精製し、酵素活性や安定性に対する糖鎖除去の影響を調査している。

Laccase, *Trametes versicolor*, deglycosylation

発表責任者：山根 祥平（15tm430g@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2J34p08
講演日時：3 月 18 日 15:55～ J 校舎 34 会場

# ラッカーゼのキメラ酵素の異種発現と酵素化学的諸性質

# Heterogeneous expression of chimeric laccase from white-rot fungi and its properties.

○門島 洸司郎[1]、野﨑 功一[1]、山根 祥平[1]、干川 康人[2]、今井 雄大[2]、京谷 隆[2]、伊藤 徹二[3]([1]信州大院・理工、[2]東北大・多元物質科学研、[3]産総研)
○Kojiro Kadoshima[1], Kouichi Nozaki[1], Shohei Yamane[1], Yasuto Hoshikawa[2], Takehiro Imai[2], Takashi Kyotani[2], Tetsuji Ito[3] ([1]Grad. School of Shinshu Univ., [2]IMRAM, [3]AIST)

【背景・目的】白色腐朽菌であるカワラタケ属が生産するラッカーゼ（Lcc）は，比活性や酸化還元電位が高く，バイオセンサーやバイオ燃料電池への応用が期待されている。しかし，酵素の構造と酵素化学的性質の関連性は，詳しくはわかっていない。*Trametes hirsuta* 由来 Lcc1（ThLcc）と *T. versicolor* 由来の Lcc1（TvLcc)は，一次構造の相同性（80%）および類似性（87%）が高い。本研究は，遺伝子工学技術によって両者のキメラ酵素を作製し，その構造変化が酵素化学的性質に及ぼす影響を調査した。

【方法】ThLcc（PDB ID:3FPX），TvLcc（PDB ID:1GYC)は，コドンを最適化した合成 cDNA を発現用ベクターpNAN8142 に連結し，麹菌を形質転換することによって発現させた。一般的に Lcc は，その構造が N 末端から D1，D2 および D3 の３つのドメインに分類される。D1 および D2 を ThLcc，D3 を TvLcc にしたキメラ酵素（ThLcc-TvLcc）を同様に調製した。組換え酵素は，0.1 mM $CuSO_4$ を含む SYP 培地に胞子を接種し，30℃，120 rpm で振盪培養することで発現させた。発現した酵素は，ABTS を使用した活性測定と Native-PAGE 後の活性染色で確認した。各酵素は硫安沈殿，疎水性相互作用および陰イオン交換クロマトグラフィー，ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて精製し，酵素化学的性質を調査した。

【結果・考察】得られた形質転換体のうち，ThLcc は培養 6 日目，ThLcc-TvLcc は培養 4 日目に最大活性を示した。また，いずれの酵素も活性染色においても活性バンドを確認することができた。精製した組換え酵素の分子量は,いずれも SDS-PAGE において 66 kDa 付近に単一バンド示した。ThLcc-TvLcc の ABTS に対する比活性は，もとの ThLcc および TvLcc に比較して大幅に減少した。これはキメラ酵素の構造は，基質から電子を引き抜く T1 銅サイトが TvLcc の構造であり，その電子を酸素に受け渡す T2/T3 銅サイトは ThLcc と TvLcc が混在した構造となるので,後者もしくは T1 銅サイトから T2/T3 銅サイトへの電子の授受に影響を及ぼしたためと考えられる。このことから，各ドメインの構造の組み合わせは，活性の発現に非常に重要であることが明らかとなった。今後は，その他の酵素化学的性質を調べ，構造変化との関連性を明らかにする予定でいる。

Laccase, *Trametes hirsuta*, *Trametes versicolor*

発表責任者：門島　洸司郎（16w1008a@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2J34p09
講演日時：3 月 18 日 16:10～ J 校舎 34 会場

ピペロナール代謝酵素の酵素学的解析

Enzymatic characterization of piperonal-converting oxidase involved in the metabolism of the botanical aromatic compounds

○土居 志織[1]、橋本 義輝[2]、富田 千晶[2]、熊野 匠人[2]、小林 達彦[2] ([1]慶應義塾大学、[2]筑波大院・生命環境)

○Shiori DOI[1], Yoshiteru HASHIMOTO[2], Chiaki TOMITA[2], Takuto KUMANO[2], Michihiko KOBAYASHI[2] ([1]Keio Univ., [2]Grad. School of Life and Environ. Sci., Univ. of Tsukuba)

ピペロナールはヘリオトロープの花の精油の主要成分であり、その独特の甘い芳香のために昔から香水として利用されてきた。現在では合成法が開発されたこともあり、食品や化粧品の香料として、また、農薬や向精神薬の原料としても頻繁に用いられている。植物由来の香気成分として、他に、シナモンに含まれるシナモアルデヒドや、バニラに含まれるバニリンなどが有名である。しかし、これら天然に存在する香気成分の生理学的な意義は、昆虫を誘引する作用、抗菌作用などが一部報告されているものの、未だよくわかっていない。そのような状況の中、我々は、ピペロナール代謝微生物を土壌より探索し、ピペロナールの自然界での代謝、それに関わる酵素を同定した。

我々は土壌より単離・同定したピペロナール代謝微生物である*Burkholderia* sp. CT39-3株よりピペロナールの代謝に関わる酵素を精製した結果、約80 kDa, 40 kDa, 20 kDaの3つのサブユニットからなるヘテロ3量体であった。さらに、ピペロナール代謝酵素遺伝子を同定し、80, 40, 20 kDaのサブユニット遺伝子をそれぞれpceL, pceM, pceSと命名した。本酵素の大量発現系を構築し、精製酵素標品を用いて本酵素反応のストイキオメトリーを、ピペロナール：酸素分子：ピペロニル酸：過酸化水素＝１：１：１：１と決定した。さらに、$NAD^+$等、種々の電子受容体を反応系に添加し、嫌気条件下で酵素反応を行うことで本酵素反応の電子受容体を検討した結果、2,6-dichlorophenol-indophenolおよびbenzoquinoneでも活性が見られたが、生理的電子受容体としては酸素分子のみで活性が見られた。これらの結果より、ピペロナール代謝酵素が酸素分子を電子受容体として用いてピペロニル酸と過酸化水素を生成する酸化酵素と同定した(1)。また、本酵素のUVスペクトルの測定結果から、鉄硫黄クラスターおよびフラビンに特異的な吸収波長が見られたため、本酵素の補因子の検討を行った。金属分析によりモリブデン原子および鉄原子を検出・定量するとともに、HPLC分析によりCMPおよびFADを検出・定量し、これらの結果と相同性検索の結果から、本酵素はPceLサブユニットに１分子のモリブドプテリン、PceMサブユニットに１分子のFAD、PceSサブユニットに2分子の2Fe-2S鉄硫黄クラスターを補因子として持つと示唆された(1)。さらに、ピペロナールを単一炭素源とし、その炭素源濃度を変えた培地で本菌を培養し、本菌の生育および培地中のピペロナールおよび代謝産物であるピペロニル酸量を定量した結果、本酵素はピペロナールの資化および解毒として機能することが示唆された(1)。また、ピペロナールが本菌株に対し毒性を有することが示唆されたため、ピペロナールの抗菌活性についても検討した。 (1) ***Sci. Rep***, **6**, 38021 (2016)

piperonal, metabolism, enzyme

講演番号：2J34p10
講演日時：3 月 18 日 16:25～ J 校舎 34 会場

麹菌 D-乳酸脱水素酵素の細菌酵素型アロステリック活性促進特性と活性阻害について
Bacterial enzyme type allosteric activation function, and the inhibition of enzyme activity of homohexameric D-lactate dehydrogenase from *Aspergillus oryzae*
○渡部 昭、佐藤 陽子、五味 勝也（東北大院・農・生物産業創成）
○Akira WATANABE, Yoko SATO, Katsuya GOMI (Tohoku Univ.)

【目的】 D-乳酸脱水素酵素(D-LDH)では、一部の細菌由来の酵素を除いてそのアロステリック特性の解析は L-LDH に比べてほとんど行われていない。先に我々は、乳酸の効率的な生産を目指し、麹菌ゲノム解析情報を利用して *Aspergillus oryzae* から D-LDH 遺伝子を探索し大腸菌で高発現させ、そのアロステリック活性促進特性について報告した(1)。本発表では、本酵素の活性阻害とその阻害機構がアロステリック制御によるかどうかを中心に、本酵素のアロステリック制御特性をさらに詳細に検討し、D-LDH のアロステリック特性について新たな知見を得ることを目的とした。
【結果と考察】 *A. oryzae* 由来の D-LDH は、SDS-PAGE、Blue Native PAGE 及びゲルろ過法を用いた解析からホモ 6 量体であると推定された(1)。本酵素は、基質(ピルビン酸)、補酵素(NADH)のみを反応系に含む場合の活性を 100%とした際に、一部の細菌由来の L-LDH でアロステリックエフェクター因子として報告されているフルクトース 1,6-ビスリン酸(FBP)1mM の存在下では約 130%まで相対活性の上昇が認められた(1)。また、アロステリック制御を受ける *Thermus aquaticus* 由来 L-LDH のアロステリックエフェクター因子であるクエン酸に関して本酵素についても解析したところ、1mM クエン酸の存在下で本酵素は 165%の相対活性を示し、ピルビン酸に対する基質飽和曲線の解析では本酵素はクエン酸によってアロステリックな活性促進を受けることが判明した(1)。この結果から、*A. oryzae* 由来の D-LDH は、真菌類由来の D-LDH としては初となる細菌酵素型のアロステリックな活性促進特性を有する酵素であると考えられた。一方、現在までに 2 例のみ報告のある真菌類である *Pythium debaryanum* 及び *Allomyces* sp. 由来の D-LDH は、細菌由来の D-LDH のようなアロステリックな活性促進特性を保持せず、各々GTP、ATP によるアロステリックな活性阻害を受けるという細菌由来の酵素とは異なるタイプのアロステリック制御機構を有することから、真菌類由来の酵素である本酵素についても解析したところ、本酵素は 4mM の GTP、ATP 存在下で相対活性が各々68%、30%まで低下し、GTP、ATP によって活性阻害を受けることが判明した。現在、この GTP、ATP 存在下での本酵素の NADH に対する基質飽和曲線を解析しており、本酵素の GTP、ATP による活性阻害が上記 *P. debaryanum*、*Allomyces* sp. 由来の酵素と同様にアロステリックな活性阻害を受けるかどうかについてと、未解析であった他のアロステリックエフェクター因子によるアロステリックな活性促進特性について報告する。

(1) 渡部ほか、2016 年度日本生物工学会大会講演要旨集、p92

*Aspergillus oryzae*, D-lactate dehydrogenase, allosteric

講演番号：2J34p11
講演日時：3 月 18 日 16:50～ J 校舎 34 会場

D-アミノ酸資化能を有する好熱性真菌の単離と D-アミノ酸オキシダーゼ遺伝子の探索
Isolation of thermophilic fungi grown on D-amino acids and identification of D-amino acid oxidase gene in the fungi
○七五三掛 湧也、高橋 祥司、阿部 勝正、解良 芳夫 (長岡技科大・生物)
○Yuya SHIMEKAKE, Shouji TAKAHASHI, Katsumasa ABE, Yoshio KERA (Nagaoka Univ. Tech.)

【背景・目的】D-アミノ酸オキシダーゼ（DAO）は，中性および塩基性 D-アミノ酸の酸化的脱アミノ反応を触媒する FAD を補酵素とするフラビン酵素である。これまでに，DAO は真菌からヒトに至る様々な真核生物種に見出されている。また近年, 一部の原核生物における存在も明らかにされた。DAO は抗生物質原料である 7-アミノセファロスポラン酸の生産において重要な酵素であるだけでなく, D−アミノ酸の検出・定量など，様々な応用的利用も期待されている。したがって，高安定性および高活性でかつ多様な基質に作用する DAO が求められている。今までに我々は好熱性細菌に高い熱安定性を有する DAO を見いだしている。しかし，その基質特異性は狭く，触媒活性も低かった。一般的に，真菌由来の DAO は高活性かつ広基質特異性であることから, 好熱性真菌由来の DAO は高い安定性を有しかつ高活性・広基質特異性を有すると考えられた。そこで本研究では，D-アミノ酸資化能を有する好熱性真菌の単離と好熱性真菌における DAO 遺伝子の探索を検討したので報告する。
【方法・結果】市販されている堆肥の懸濁液をクロラムフェニコールとゲンタマイシンを含むポテトデキストロース寒天培地に塗布し，50℃で培養を行ったところ 3 種の好熱性糸状菌が得られた。これら糸状菌を，炭素源をグルコース，窒素源を 50 mM 各種 D−アミノ酸（D-Ala, D-Asn, D-Gln, D-His）とした最小寒天培地において 50℃で培養したところ，いずれの糸状菌も各 D−アミノ酸で良好に生育した。したがって，これら糸状菌は DAO を有する可能性が高いと考えられた。これら糸状菌の生物種を同定するため, ゲノム DNA を鋳型とした PCR により ITS 領域を増幅し, その塩基配列を解析した。分子系統解析の結果, これら糸状菌の 1 種は *Rasamsonia emersonii* と, 残り 2 種は *Thermomyces dupontii* と同種または近縁種であることが分かった。*T. dupontii* のゲノム配列は明らかにされているため, DAO ホモログ遺伝子を探索したところ，2 つの DAO ホモログ遺伝子が見いだされた。これら遺伝子の推定アミノ酸配列から 1 つは DAO, 他方は D−アスパラギン酸オキシダーゼをコードすると考えられた。加えて, ゲノム配列が明らかな他の好熱性真菌において DAO ホモログ遺伝子を探索したところ, 種々の好熱性真菌に DAO ホモログ遺伝子の存在が確認された。単離した *R. emersonii* のゲノム配列は明らかにされていないため，現在ゲノム配列を解析している最中である。今後，これら好熱性真菌に見いだされた DAO ホモログ遺伝子を大腸菌で発現させ，その機能を解析していく予定である。

D-Amino acid oxidase (DAO), Thermophilic fungi, D-Amino acids

発表責任者：高橋 祥司（shoutaka@vos.nagaokaut.ac.jp）

講演番号：2J34p12
講演日時：3 月 18 日 17:05～ J 校舎 34 会場

ニトリル合成酵素の酸化還元反応触媒能
Nitrile-synthesizing heme enzyme: unique activities
○橋本 義輝、山田 優駿、熊野 匠人、小林 達彦（筑波大院 生命環境）
○Yoshiteru HASHIMOTO, Masatoshi YAMADA, Takuto KUMANO, Michihiko KOBAYASHI (Grad. School of Life and Environ. Sci., Univ. of Tsukuba)

アルドキシムデヒドラターゼはニトリルの合成に関与するヘム酵素として発見、一般的にニトリル分解・代謝酵素群と遺伝子クラスターを構成する。(アクリロニトリルから)アクリルアミド工業生産の第二世代菌として使用された *Pseudomonas chlororaphis* B23 株のニトリル代謝クラスターの上流にも本酵素遺伝子が存在する。我々はこれまでに本菌株のアルドキシムデヒドラターゼ(OxdA)を単離精製し、本酵素の諸性質を解析し、本酵素は水溶液中での反応にも関わらずアルドキシム（炭素-窒素２重結合）を脱水してニトリル（炭素-窒素３重結合）を形成する反応を触媒し、極度の光解離性を示すなど希有な特徴を持つことを明らかにした [1-3]。さらに、本酵素の立体構造を明らかにし、OxdA 変異酵素の酵素学的および物理学的特徴付けにより反応機構の全貌を解明した [4]。

OxdA の脱水反応以外の触媒能を調査し、これまでに酸化還元反応の一つであるカタラーゼ活性の検出に成功している。本研究では、さらに異なる触媒能を調査するために、ペルオキシダーゼ活性とペルオキシゲナーゼ活性を検討することにした。

OxdAの発現ベクターを用いて*Escherichia coli* BL21codon plus (DE3) RIL 株で大量発現させ、OxdAを大量に精製した。本酵素を用いて、過酸化水素の他に、２種類の異なる基質を用いて酵素活性を測定した結果、どちらの基質を用いた場合においても、OxdAのペルオキシダーゼ活性の検出に成功した。続いて、それぞれの酵素活性のキネティックパラメーターを決定した。次に、過酸化水素とペルオキシゲナーゼ用基質を用いて活性測定を行った結果、OxdAのペルオキシゲナーゼ活性の検出にも成功した。同活性についてもキネティックパラメーターを決定した。

これまでのカタラーゼ活性の報告と合わせ、我々は OxdA の脱水反応以外の触媒能として、カタラーゼ反応、ペルオキシダーゼ反応、ペルオキシゲナーゼ反応の３つの酸化還元反応を触媒し得ることを実証した。本結果は、酵素としての本来の触媒反応が酸化還元反応ではないヘム酵素が、酸化還元反応を触媒したことを見いだした初めての例である。

(1) ***J. Biol. Chem.*, 278,** 29600 (2003); (2) ***J. Biol. Chem.*, 279,** 47619 (2004); (3) ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA***, **103,** 564 (2006); (4) ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA***, **110,** 2810 (2013)

nitrile, enzyme, synthesis

講演番号：2J34p13
講演日時：3 月 18 日 17:20～ J 校舎 34 会場

*Eggerthella* sp. YY7918 株由来の旧黄色酵素 ダイゼインレダクターゼの機能解析
Characterization of daidzein reductase, an old yellow enzyme from *Eggerthella* sp. YY7918: homo-octameric subunits structure and FMN/FAD/4Fe-4S cofactors

○川田 結花[1]、五島 智子[2]、澤村 理恵[2]、横山 慎一郎[2,3]、丹羽 利夫[4]、柳瀬 笑子[2]、稲垣 瑞穂[2]、海老原 章郎[2]、山口 圭一[5]、加藤 雄太[6]、桑田 一夫[5]、櫻田 修[6]、鈴木 徹[2] ([1]岐阜大・連合農学研究科、[2]岐阜大・応用生物科学部、[3]岐阜県産業技術センター、[4]修文大・健康栄養学部、[5]岐阜大・連合創薬医療情報研究科、[6]岐阜大・工学部)
○Yuika Kawada[1], Tomoko Goshima[2], Rie Sawamura[2], Shin-ichiro Yokoyama[2,3], Toshio Niwa[4], Emiko Yanase[2], Mizuho Inagaki[2], Akio Ebihara[2], Keiichi Yamaguchi[5], Yuta Kato[6], Kazuo Kuwata[5], Osamu Sakurada[6], Tohru Suzuki[2] ([1]Unit. Grad. Sch. of Agric. Sci., Gifu Univ., [2]Fac. of Appl. Biol. Sci., Gifu Univ., [3]Ind. Technol., Gifu Pref. Gov., [4]Fac. of Health and Nutr., Shubun Univ., [5]Unit. Grad. Sch. of Drug Discov. Med. Inform. Sci., Gifu Univ., [6]Fac. of Eng., Gifu Univ.)

【背景】
大豆イソフラボンの一種である daidzein は、特定の腸内細菌に代謝されて equol に変換される。equol は、更年期における諸症状の緩和や骨代謝の改善効果が期待されている。

daidzein から equol への変換には daidzein reductase に加え、計 3 つの reductase が関与しており、我々は過去に equol 産生菌 *Eggerthella* sp. YY7918 株由来のこれらの reductase に関して報告した。BLASTP の結果、特に daidzein reductase は equol 産生酵素群の中でも equol 産生菌間で多様性を示し、更に old yellow enzyme (OYE) に属していた。OYE はフラビンを含むこと、C=C を NAD(P)H を用いて立体選択的に還元することが特徴である。しかし粗精製した組換え酵素由来 daidzein reductase を用いて daidzein の還元を検証したところ、 立体選択性が見られず (*R*,*S*)-dihydrodaidzein が生成された。

そこで今回、我々は His-tag、ゲルろ過、陰イオン交換クロマトグラフィーを組み合わせて高度に精製した daidzein reductase を用いて諸性質を解明し、さらに X 線小角散乱 (SAXS) 及びクライオ電子顕微鏡 (cryo-EM) による構造解析を試みた。

【結果】
今回新たに精製した *Eggerthella* sp. YY7918 の daidzein reductase は daidzein 及び genistein の 2, 3 位の二重結合を立体選択的に還元した。更にこれまで glycitein 及び formononetin の反応に関して知られていなかったが、MS によって dihydro 化を確認できた。また BLASTP の結果、配列上に FMN binding site と 4Fe-4S クラスターが存在しており、立体構造が既知であるものの中では *E.coli* の 2,4-Dienoyl-CoA Reductase (DCR1; EC 1.3.1.34) と相同性を示した。HPLC あるいは ICP 発光分光分析によって分析した結果、FMN、FAD、及び $4Fe^{2+}$/mol が含まれることを確認した。

ゲルろ過クロマトグラフィーにより得られた画分では、ホモ 8 量体構造と推定される画分のみが活性を示すことが示唆された。SAXS で得られた分子量は daidzein reductase のモノマーの約 8 倍であり、そのビーズモデルに DCR1 の構造を重ね合わせると DCR1 が 8 分子含まれる形状であった。daidzein reductase はホモ 8 量体構造となることで活性を示すことが明らかになった。さらに cryo-EM で得られた daidzein reductase の画像においてもホモ 8 量体構造を持つことが支持された。以上の結果から、daidzein reductase はホモ 8 量体構造となることで活性を示すことが明らかになった。

isoflavone, equol, flavin

発表責任者：川田結花（s6103001@edu.gifu-u.ac.jp）

講演番号：2J34p14
講演日時：3 月 18 日 17:35～ J 校舎 34 会場

# 補因子結合に伴う 3α-hydroxysteroid dehydrogenase の構造変化の解析

# Structural dynamics of 3α-hydroxysteroid dehydrogenase induced by co-factor binding

○稲葉 理美[1]、吉田 卓也[2]、織田 昌幸[1] ([1]京府大院生命環境科学、[2]阪大院薬)
○Satomi Inaba[1], Takuya Yoshida[2], Masayuki Oda[1] ([1]Kyoto Pref. Univ., [2]Osaka Univ.)

【背景・目的】*Pseudomonas* sp. B-0831 株由来 3α–hydroxysteroid dehydrogenase（*Ps*3αHSD）は，NAD(P)$^+$ 依存的にステロイド環の 3 位のケトン基とヒドロキシル基を可逆的に酸化還元する分子量 26 k の酵素で，溶液中では二量体で存在・機能する。NADH との複合体結晶構造解析から，補因子が結合したホロサブユニットと結合していないアポサブユニットからなるヘテロ二量体構造をとり，さらに補因子結合には負の協同性が働くことが示されている（図 1）。本研究では，溶液中での補因子結合に伴う詳細な動態解明を目的とし，超高磁場 NMR と等温滴定熱量計（ITC）による解析を行った。

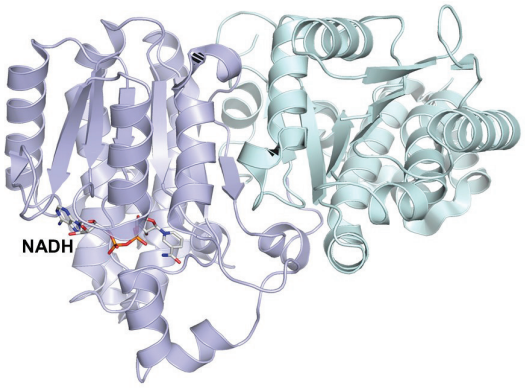


図1. *Ps*3aHSDとNADHとの複合体結晶構造 (PDB ID: 2DKN)

【材料・方法】NMR 測定用のタンパク質は，$^{15}NH_4Cl$ を含む M9 最小培地で発現させた $^{15}$N-均一標識試料，および $^{15}$N-Tyr を含む最小培地で発現させたアミノ酸選択標識試料を用いた。補因子結合に伴う動態変化は，$^{15}$N/$^{1}$H-HSQC により，さらに補因子との結合熱力学量を ITC により解析した。

【結果・考察】$^{15}$N-均一標識試料を用いた $^{15}$N/$^{1}$H-HSQC 測定では，高分子量（二量体で 56 k）のため交差信号強度が著しく弱く，解析困難であった。そこで，Ps3αHSD の 4 つの Tyr 残基（Y87, Y153, Y158，Y200，図 2）を選択的に $^{15}$N 標識し試料で測定を行ったところ，全ての Tyr 残基の信号が分離して観測された。さらに，各種 Phe 変異体を用いることで，4 つの Tyr 残基全ての帰属に成功した。次に，これらの $^{15}$N-Tyr 標識試料を用いて NADH 滴定解析を行ったところ，Y87 および Y153 は化学シフトの比較的大きな変化が観測されたのに対し（$\delta_N$ > 0.4 ppm, $\delta_H$ > 0.1 ppm），Y158 はその程度が小さかった。また，Y200 は補因子結合に伴って信号強度が大幅に減少した。一方，ITC による結合解析から，NADH 結合はエンタルピー駆動で，結合定数は $10^4$ ($M^{-1}$) オーダーであった。本発表では，活性測定などの解析結果も併せて，補因子結合と負の協同性，機能への役割などを議論したい。

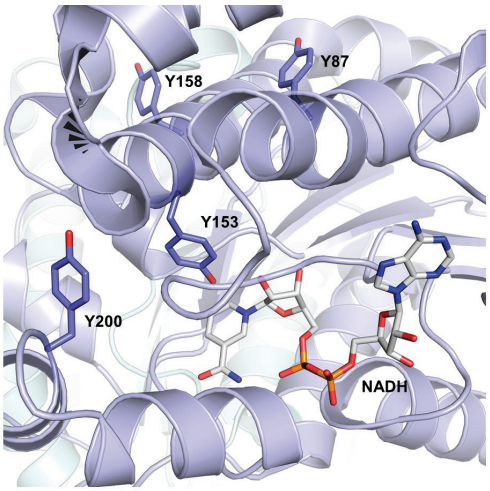


図2. 4つのTyr残基の位置とNADH結合部位 (PDB ID: 2DKN)

NMR, ITC, co-factor binding

発表責任者：織田昌幸（oda@kpu.ac.jp）

講演番号：2J34p15
講演日時：3 月 18 日 17:50～ J 校舎 34 会場

# オオムギにおけるアグマチンクマロイルトランスフェラーゼの解析
# Characterization of agmatine coumaroyltransferase from barley

○山根 美代[1]、矢嶋 俊介[2]、須恵 雅之[3]([1]東農大・農化、[2]東農大・バイオ、[3]東農大・生応化)
○Miyo YAMANE[1], Shunsuke YAJIMA[2], Masayuki SUE[3] ([1]Dept. Agr. Chem., Tokyo Univ. Agr., [2]Dept. Biosci., Tokyo Univ. Agr., [3]Dept. Appl. Biol. Chem., Tokyo Univ. Agr.)

【背景・目的】

オオムギ（*Hordeum vulgare*）には、病害に対する耐病性二次代謝化合物としてホルダチン類が蓄積されている。ホルダチンの生合成は 2 段階で行われ、まず、ヒドロキシ桂皮酸類（クマル酸またはフェルラ酸）の CoA エステル（Cou-CoA または Fer-CoA）とアグマチン(Agmt)が縮合してクマロイルアグマチン（Cou-Agmt）もしくはフェルロイルアグマチン（Fer-Agmt）が生成し、さらにそれらが酸化的カップリングにより二量体化することで生じる。この最初の縮合反応を触媒するアシル基転移酵素（アグマチンクマロイルトランスフェラーゼ；ACT）は、これまでにオオムギより単離・クローニングされ、大腸菌での過剰発現などが行われている。植物アシル基転移酵素の BAHD ファミリーは、その一次構造により大きく 5 つの clade に分類され、オオムギ ACT（HvACT）は clade IV に属する酵素である。Clade IV は BAHD ファミリーの中で最小の clade であり、オオムギ HvACT の他に類似の配列としてコムギやイネが知られているが、酵素活性に関する報告はオオムギのみである。そこで本研究では、clade IV の構造と機能の関係を明らかにすることを主な目的として、オオムギにおける HvACT の性状を精査することにした。

【方法・結果】

オオムギより *HvACT* 遺伝子を PCR により単離後、大腸菌で発現させるために pET28a に挿入し、BL21CodonPlus(DE3)-RP に導入した。また、酵母での発現のためには pPICZA に挿入後、*Pichia Pastoris* に導入した。大腸菌でタンパク質の発現誘導後、アフィニティークロマトグラフィーにより精製し SDS-PAGE を行ったところ、ほぼ単一のバンドとなった。しかし、これらをゲル濾過やイオン交換クロマトグラフィーに供したところ、酵素活性を示す複数のピークが検出され、HvACT は複数の状態の凝集体を形成しているものと考えられた。この結果は、酵母を用いた場合も同様であった。バッファーに DTT を添加することにより改善が見られ、上記クロマトグラフィーにおいて単一のピークとして単離することができた。この酵素を用いて、酵素活性の測定および結晶化のスクリーニングを行った。結晶化において、14% PEG8000、0.1 M MES (pH 6.5)などの条件で結晶が得られ、現在、構造解析を進めている。

agmatine coumaroyltransferase, acyltransferase, barley

講演番号：2J34p16
講演日時：3 月 18 日 18:05～ J 校舎 34 会場

鉄硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 由来テトラチオン酸ハイドロラーゼの結晶構造解析
Structural and functional analysis of Tetrathionate hydrolase from acidophilic iron- and sulfur-oxidizing bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*

○長谷 成記[1]、小坂 恵[2]、玉田 太郎[3]、上村 一雄[1]、金尾 忠芳[1]（[1]岡山大院・環境生命、[2]岡山大・自科支セ、[3]量子研・QST）
○Naruki HASE[1], Megumi Kosaka[2], Taro Tamada[3], Kazuo Kamimura[1], Tadayoshi Kanao[1] ([1]Grad. Sch. Environ & Life Sci., Okayama Univ., [2]Adv. Sci. Res. Center, Okayama Univ., [3]QST)

【背景と目的】鉄硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* は、二酸化炭素を唯一の炭素源とし、生育のためのエネルギーを二価鉄または還元型無機硫黄化合物を酸化することにより獲得する、好酸性の化学合成独立栄養細菌である。我々は本菌の異化的硫黄代謝における鍵酵素の一つ、テトラチオン酸ハイドロラーゼ（4THase）を分離精製し、これをコードする遺伝子（*Af-tth*）を同定した。

4THase は、テトラチオン酸（$S_4O_6^{2-}$）を単体硫黄（$S^0$）とチオ硫酸（$S_2O_3^{2-}$）、そして硫酸（$SO_4^{2-}$）へと加水分解する反応を触媒する。本酵素は、*Acidithiobacillus* 属と一部の好酸性微生物からのみ活性が報告されている非常にユニークな酵素である。これまで報告されている他の多くの硫黄代謝酵素では Cys 残基のチオール基が基質の硫黄原子とジスルフィド結合を形成することが知られており、これらの活性中心には Cys 残基が保存されている。しかしながら、本酵素に唯一存在する Cys 残基を Ala 置換した変異酵素の研究から Cys 残基は触媒反応に関与しないことが解明された。このことから本酵素は Cys 残基が関与しない新規な反応機構を有することが期待された。本研究では組み換え *Af*-Tth の結晶を用いた X-線結晶構造解析を行い、基質と相互作用するアミノ酸残基を特定し反応機構を推定することを目的とした。

【方法と結果】組換え大腸菌より得た *Af*-Tth の封入体を refolding することで活性型酵素を獲得し、各種クロマトグラフィーにより高度に精製した後、これの結晶化に成功した。得られた結晶を用いて基質のテトラチオン酸を含む溶液に浸すことで酵素-基質複合体を形成させ X-線照射による回折像を収集、結晶構造解析を行った。その結果、基質のテトラチオン酸と考えられる電子雲を本酵素の構造内に観察することができた。また、基質から 3.2Åの距離に Asp 残基が存在していることを確認したため、これが触媒残基として働くことが示唆された。この Asp 残基は *A. ferrooxidans* を含む *Acidithiobacillus* 属や *Acidianus ambivalens* 由来の 4THase でも保存されていることからも重要な役割を担うと考えられた。そこで部位特異的変異導入により Asp 残基を Asn 残基に置換した変異酵素を組換え大腸菌から獲得し、野生型酵素と同様の方法で refolding することにより可溶性のタンパク質として得ることができた。refolding された変異酵素を用いて機能解析を行ったところ活性は完全に消失していた。したがって、この Asp 残基は本酵素の触媒反応に必要不可欠であると考えられる。我々はの Asp 残基が関与すると考えられるテトラチオン酸加水分解反応メカニズムの第一段階目を提案する。

Tetrathionate hydrolase, sulfur metabolism, *Acidithiobacillus ferrooxidans*

講演番号：3A01a01
講演日時：3 月 19 日 09:20～ A 校舎 01 会場

フルクトース誘導性脂肪肝によるセリン代謝変動
Regulation of serine metabolism by fructose-induced fatty liver
○清水 誠、井上 聖哉、井上 順、佐藤 隆一郎（東大院農生科・応生化）
○MAKOTO SHIMIZU, SEIYA INOUE, JUN INOUE, RYUICHIRO SATO (The Univ. of Tokyo)

非アルコール性脂肪肝（NAFLD）は、肝硬変など重大な肝疾患に繋がる危険因子であり、我が国の患者数は 3000 万人を超えると推定されている。NAFLD は、炭水化物の過剰摂取や高脂肪食など栄養過多による原因が広く知られている。一方、タンパク質・アミノ酸の摂取不足も脂肪肝を発症する。我々はこれまで、アミノ酸インバランスにより転写因子 ATF4 を介して抗肥満ホルモン FGF21 の発現が亢進し、メチオニン・コリン欠乏性脂肪肝を抑制するメカニズムを提唱した。本研究では、他の脂肪肝モデル（フルクトース、高脂肪食）を用いてアミノ酸代謝関連遺伝子を中心に ATF4 の標的因子の解析を行った。

野生型マウスに 30%フルクトース水または高脂肪食を 2 週間与え脂肪肝を発症させた。肝臓における ATF4 の標的遺伝子の発現解析を行った結果、セリン合成酵素 psat1（phosphoserine aminotransferase 1）の遺伝子発現のみがフルクトースで増加することを見出した。他のセリン合成酵素（phgdh、psph）の発現もフルクトースによる増加が見られた。一方、高脂肪食ではセリン合成酵素の発現変動は認められなかった。肝臓のアミノ酸含量を分析した結果、フルクトース水によるセリン含有量の有意な増加が確認された。これらの結果から、フルクトース誘導性脂肪肝ではセリン生合成が活性化されることが示された。

セリン合成酵素の発現制御機構の解析のため、アデノウイルスを用いてフルクトースや脂肪肝で活性化される転写因子（ChREBP、SREBP-1）を肝細胞に過剰発現させた。遺伝子発現の結果、これらの転写因子によるセリン合成酵素の発現亢進は見られなかった。ラット初代肝細胞を用いた実験の結果、フルクトースではなくインスリンもしくはグルココルチコイドがセリン合成酵素の重要な発現制御因子であることが示された。

NAFLD におけるセリンの生理的意義を検証するため、野生型マウスに高セリン食またはセリン欠乏食とフルクトース水を同時摂取させた。その結果、高セリン食による肝トリグリセリド量の有意な低下が見られたが、セリン欠乏食では変動は見られなかった。現在、内在のセリン合成を活性化させるため、アデノウイルスを用いてセリン合成酵素の過剰発現実験を行っている。

以上の結果から、フルクトース誘導性脂肪肝ではセリン合成が活性化されることが示された。本発表ではそのメカニズムについても議論したい。

serine, NAFLD, fructose

講演番号：3A01a02
講演日時：3 月 19 日 09:35～ A 校舎 01 会場

# ATF4-FGF21 経路を活性化する新規食品成分の探索・解析

Search and analysis of novel food factors which activate the ATF4-FGF21 pathway.

○藤木 航平、丸山 竜人、清水 誠、井上 順、佐藤 隆一郎（東大院 農生科・応生化）
○Kohei FUJIKI, Ryuto MARUYAMA, Makoto SHIMIZU, Jun INOUE, Ryuichiro SATO (The Univ. of Tokyo)

[背景・目的]

肥満症は脂肪組織において余剰なエネルギーを脂肪滴として蓄積することに起因する疾患である。肝臓において合成、分泌される線維芽細胞増殖因子 FGF21 は白色脂肪組織における糖取り込みや脂肪滴分解の促進し、抗肥満効果、インスリン感受性の改善効果を示す。FGF21 アナログの投与は脂質代謝を改善する。我々は日常的な食品成分の摂取による肥満症対策として体内で産生される FGF21 に着目している。これまで我々は FGF21 が転写因子 ATF4 の標的遺伝子であることを報告した。本研究では ATF4 活性化による FGF21 発現を亢進する食品成分の探索を行った。

[方法・結果]

我々が保有する 455 種類の食品成分ライブラリを用いて ATF4 を活性化する食品成分のスクリーニングを行った。ATF4 活性化の評価は ATF4 の制御機構である翻訳制御領域と外因性プロモーターを含むルシフェラーゼプラスミドを用いた。小胞体ストレスを惹起する食品成分を除外するために、BiP のレポータープラスミドを用いたスクリーニングも同時に行った。以上 2 つのレポータープラスミドをヒト腎臓癌由来細胞 HEK293 細胞にそれぞれトランスフェクションし、各食品成分を処理し細胞を回収した。ルシフェラーゼ活性の結果、ATF4 を活性化する食品成分を複数見出した。

次にスクリーニングで同定した食品成分による FGF21 の発現亢進を検証するためヒト肝癌由来細胞 HepG2 細胞を用いて検証した。その結果、内在性 ATF4 の活性化及び、FGF21 の遺伝子発現を亢進する食品成分 X を同定した。

また、レポーターアッセイによる解析の結果、食品成分は ATF4 標的配列依存的に FGF21 のプロモーターを活性化させた。また食品成分による FGF21 発現亢進の ATF4 依存性を検証した。アデノウイルスを用いた実験の結果、ATF4 をノックダウンすると、食品成分による FGF21 の発現亢進が有意に減弱した。さらに FGF21 の発現を制御する核内受容体に関する検証の結果より、食品成分が ATF4 を選択的に活性化することが示唆された。同定した他の食品成分についても、その制御機構等についても、合わせて報告する予定である。

FGF21, ATF4, food factor

講演番号：3A01a03
講演日時：3 月 19 日 09:50～ A 校舎 01 会場

# 酸化コレステロールは INSIG-2 を介して ATF4 の発現を制御する

# Oxysterols regulate ATF4 expression via INSIG-2

○三吉 翔子、渡邉 雄一、清水 誠、井上 順、佐藤 隆一郎（東大院農生科・応生化）
○Shoko MIYOSHI, Yuichi WATANABE, Makoto SHIMIZU, Jun INOUE, Ryuichiro SATO (The Univ. of Tokyo)

【目的】

コレステロールは、生体内で種々の酵素により酸化される。酸化コレステロールは、コレステロール代謝を最も強力に制御する因子の一つであり、そのメディエーターとして働くタンパク質が小胞体膜上に存在する INSIG (Insulin-induced gene)-1/-2 である。INSIG は、酸化コレステロールが結合すると安定化し、SCAP や gp78 を介して脂質代謝を制御することが知られていたが、近年、抗ウイルス機能を持つ STING の機能も制御することが報告されるなど、細胞内のシグナル伝達分子としてさらなる未知の機能を有すると考えられる。我々は、酸化コレステロールが、抗肥満作用を持つ FGF21 (Fibroblast growth factor 21)やストレス応答遺伝子の発現を制御する転写因子 ATF4 (Activating transcription factor 4)のタンパク質量を増加させることを見出した。そこで本研究では、INSIG 欠損 CHO 細胞株を用いて、酸化コレステロール–INSIG による ATF4 発現制御メカニズムの解明を試みた。

【方法】

CHO-7 細胞と INSIG 欠損 CHO-7 細胞株 SRD-15 を用いて、25-hydroxycholesterol(HC)をはじめとする 8 種の酸化コレステロール応答について、ウエスタンブロット、RT-qPCR により、タンパク質ならびに遺伝子発現解析を行った。また、SRD-15 を用いて INSIG-1、INSIG-2 を安定に発現する細胞株をそれぞれ樹立し、INSIG-1 と-2 の分子機能の差異について検証した。

【結果・考察】

8 種の酸化コレステロールについて、5 μM、24h 処理した結果、25HC および 27HC において、CHO-7 で ATF4 タンパク質の発現亢進が認められた。一方で、SRD-15 では ATF4 の発現が亢進せず、ATF4 タンパク質発現に INSIG の関与が示唆された。また、安定発現株の INSIG-1 は 25HC 添加により安定化するが、INSIG-2 は 25HC の有無に関わらず安定であった。このとき INSIG-1 安定発現株では ATF4 タンパク質の発現亢進が回復せず、INSIG-2 安定発現株でのみ回復したことから、25HC による ATF4 タンパク質の発現亢進は INSIG-2 を介することが明らかになった。

oxysterol, INSIG, ATF4

講演番号：3A01a04
講演日時：3 月 19 日 10:05～ A 校舎 01 会場

# 脂肪酸合成制御因子 MIG12 の遺伝子欠損マウスの解析

Analysis of MIG12 knock out mouse

○成田 淳子、清水 誠、井上 順、佐藤 隆一郎（東大院　農生科・応生化）
○Junko NARITA, Makoto SHIMIZU, Jun INOUE, Ryuichiro SATO (The University of Tokyo)

【背景と目的】

LXR(Liver X Receptor)は脂質代謝関連遺伝子の転写制御に関わる核内受容体である。我々は、LXR の新規標的遺伝子として MIG12 を同定し、本遺伝子が脂肪酸・トリグリセリド合成に関与することを示してきた[1)]。MIG12 は脂肪酸合成の律速酵素である ACC(Acetyl-CoA Carboxylase)のポリマー化を亢進することにより ACC を活性化し、脂肪酸合成を上昇させる。MIG12 を介した脂肪酸合成の抑制は脂肪肝や糖尿病等の生活習慣病の改善に寄与することが期待されるが、生体内における MIG12 の機能に関しては報告が少ない。そこで今回我々は MIG12 遺伝子欠損マウスを作製・解析し、MIG12 遺伝子の欠損による生体への影響を検証した。

【方法】

MIG12 遺伝子欠損マウスは CRISPR/Cas9 システムを用いて作製した。この遺伝子欠損マウスにおいて、肝臓中脂質、血中脂質、脂肪酸構成比、脂質代謝関連の遺伝子発現量等を野生型マウスと比較した。また MIG12 は LXR 活性化時の脂質合成上昇に関与することから、マウスに LXR 合成リガンド T0901317 を投与し、その効果が遺伝子欠損によって受ける影響を調べた。さらに遺伝子欠損マウスに高炭水化物食の長期負荷を行い、糖から脂肪酸・トリグリセリドへの合成が野生型マウスと比較してどのように変動するか検証した。

【結果と考察】

野生型マウスと MIG12 遺伝子欠損マウスを比較すると肝臓中・血中トリグリセリド量に変化はなかったが、遺伝子欠損マウスは低炭素数の脂肪酸が増加していた。また脂肪酸合成酵素等の脂質代謝関連遺伝子の発現に変化はなかったが、MIG12 とアミノ酸レベルで高い相同性を持つ Spot14 の遺伝子発現が遺伝子欠損マウスにおいて上昇傾向であった。さらに T0901317 投与時に野生型マウスでは肝臓の ACC のポリマー化が亢進するが、遺伝子欠損マウスではその亢進が見られなくなった。このことから肝臓における ACC は MIG12 遺伝子欠損によりその活性が低下していると考えられるが、肝臓中脂質量、血中脂質量に変化はなかった。MIG12 は肝臓だけではなく脂肪組織や骨格筋にも発現しているため、肝臓以外の組織の影響も受けていると思われる。高炭水化物食の長期負荷マウスについては現在解析中である。

1) J. Inoue *et al.* Mol. Endocrinol. **25**, 995–1005. (2011)

MIG12, lipid synthesis, knock out mouse

講演番号：3A01a05
講演日時：3 月 19 日 10:20～ A 校舎 01 会場

# 胆汁酸受容体 TGR5 が骨格筋機能に及ぼす影響および発現調節機構の解析

# The effect of bile acid receptor TGR5 on skeletal muscle function and its expression mechanism

○佐々木 崇[1]、三田 萌子[1]、村田 翔太朗[1]、久保山 文音[2]、清水 誠[1]、井上 順[1]、佐藤 隆一郎[1] ([1]東大院農生科・応生化、[2]東大農)
○Takashi SASAKI[1], Moeko MITA[1], Shotaro MURATA[1], Ayane KUBOYAMA[2], Makoto SHIMIZU[1], Jun INOUE[1], Ryuichiro SATO[1] ([1]Grad. Sch. of Agri. and Life Sci., Univ. of Tokyo, [2]The Univ. of Tokyo)

【研究の背景と目的】摂食に応じて消化管に分泌される胆汁酸は、脂溶性の食品成分やビタミン類の消化吸収を助けるばかりでなく、それ自体がシグナル分子として働き、様々な代謝変動を引き起こすことが知られている。とりわけ胆汁酸は食後に血中濃度が大きく上昇することから、摂食シグナルを伝達する因子と考えられている。胆汁酸受容体として発見された G タンパク質共役受容体 TGR5 は様々な組織に発現が認められ、活性化により抗肥満効果や糖代謝改善効果を発揮する。これらの作用は褐色脂肪組織での熱産生亢進や小腸での GLP-1 分泌亢進により説明されているものの、TGR5 の機能については未知の部分も多い。特に、骨格筋における TGR5 の機能に関しては知見が乏しく、詳細な解析が望まれていた。そこで本研究では、骨格筋における TGR5 の機能解明を試みた。

【方法と結果】全身性 TGR5 ノックアウト（KO）マウスを用いて TGR5 が骨格筋へ及ぼす影響を解析したところ、KO マウスでは有意な骨格筋量の減少および筋力低下が確認された。我々は骨格筋 TGR5 が筋量増大に寄与すると予測し、骨格筋特異的に TGR5 を過剰発現するトランスジェニック（Tg）マウスを作出し、そのフェノタイプ解析を行った。その結果、Tg マウスは同腹仔の野生型（WT）マウスと比較して骨格筋重量が 10%程度増加していた。また筋重量の上昇に伴い、筋繊維横断面積や筋力の有意な増大が認められた。Tg マウスへの胆汁酸投与により筋肥大や萎縮に関わるいくつかの遺伝子発現に大きな変動が生じたため、これらが TGR5 による筋量増大効果の一部を説明するものと考えられる。続いて我々は骨格筋における TGR5 発現調節機構の解析を行った。興味深いことに、TGR5 mRNA 発現量は運動後の骨格筋で有意に上昇することが明らかとなり、更にこの発現上昇を制御する転写因子、およびその結合領域の同定に成功した。

【考察】遺伝子改変マウスを用いた実験より、胆汁酸受容体 TGR5 が新たな筋肥大誘導因子であることが示され、更に TGR5 が運動後の骨格筋で発現上昇することが明らかとなった。これらの結果は、TGR5 を軸とし、運動と摂食が相乗的に筋肥大を誘導するシステムの存在を示唆している。超高齢社会を迎えた我が国では、加齢に伴う筋量の低下（サルコペニア）が深刻な問題となっており、高齢者の QOL 低下や医療費の増大を招いている。本研究結果より、骨格筋 TGR5 に着目したアプローチがこれらの問題解決に貢献すると期待される。

skeletal muscle, bile acid, tgr5

講演番号：3A01a06
講演日時：3 月 19 日 10:45～ A 校舎 01 会場

マスリン酸による筋肥大効果の解析
Effect of maslinic acid on skeletal muscle hypertrophy
○村田 翔太朗、佐々木 崇、清水 誠、井上 順、佐藤 隆一郎（東大院農生科・応生化）
○Shotaro MURATA, Takashi SASAKI, Makoto SHIMIZU, Jun INOUE, Ryuichiro SATO (The Univ. of Tokyo)

【目的】
高齢社会を迎えた我が国において、筋萎縮に伴う運動機能の低下（ロコモティブシンドローム）は要介護のリスクファクターとなり、健康寿命の短縮、医療費の増大の原因となっている。そのため健全な食生活による運動機能の維持が望まれ、筋萎縮を抑制する食品成分の探索およびその分子機構の解明はロコモティブシンドロームを解決する上で重要であるといえる。当研究室では胆汁酸受容体 TGR5 が骨格筋において筋肥大効果を持つことを明らかにしており（日本農芸化学会 2016 佐々木崇）、TGR5 は骨格筋量制御における重要なターゲットである。本研究では TGR5 を活性化する食品成分の探索を行い、その筋肥大効果の検証と分子メカニズムの解明を目的とした。

【方法】
食品成分による TGR5 の活性化はレポーターアッセイにより評価した。すなわち TGR5 の発現プラスミドと、TGR5 の活性化に応答する CRE 配列を挿入したレポータープラスミドを HEK293 細胞にトランスフェクションし、食品成分投与後のルシフェラーゼ活性によって TGR5 リガンド活性を評価した。続いて、食品成分による筋肥大効果を評価するために培養骨格筋細胞 C2C12 に対する食品成分の投与実験を行った。puromycin を用いた SUnSET 法によるタンパク質生合成量の評価や、ウエスタンブロットによる各種タンパク質の発現やリン酸化の測定などを行った。

【結果と考察】
レポーターアッセイによってトリテルペノイドの一種であるマスリン酸に TGR5 リガンド活性があることを発見した。また、C2C12 にマスリン酸を投与した実験ではタンパク質生合成の亢進や、筋肥大に関わるシグナル経路の一つ、mTOR シグナル経路の活性化などが見られ、マスリン酸が筋肥大効果を持つことが示唆された。これらの結果はマスリン酸が筋萎縮抑制効果を持つ食品成分として有望であることを示している。さらに、マスリン酸は関節炎抑制効果があることも報告されており、筋肥大効果と関節炎抑制効果の両方の機能を持つ食品成分として、高齢者の運動機能改善に対する有効な解決策に繋がることが期待される。

skeletal muscle, triterpenoid, tgr5

講演番号：3A01a07
講演日時：3 月 19 日 11:00～ A 校舎 01 会場

肝臓における胆汁酸受容体 TGR5 の発現制御機構解析
The elucidation of TGR5's expression regulation in liver.
○松木 美紗、佐々木 崇、清水 誠、井上 順、佐藤 隆一郎（東大院農生科・応生化）
○Misa MATSUKI, Takashi SASAKI, Makoto SHIMIZU, Jun INOUE, Ryuichiro SATO (The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】
7 回膜貫通型の G タンパク質共役受容体 TGR5 は胆汁酸をリガンドとし、肝臓や褐色脂肪組織、小腸、骨格筋などに広く発現が認められており、褐色脂肪組織や小腸 L 細胞において抗肥満効果・抗糖尿病効果を発揮することが知られている。一方、肝臓においては、TGR5 の活性化により肝臓の炎症やガンの発達を抑制することが知られている。しかし、その発現制御機構に関しては不明である。そこで本研究では、肝臓での TGR5 の発現制御機構の解明を目的とした。
【方法・結果】
ヒト肝ガン由来細胞 HepG2 細胞に様々な食品成分や薬剤を投与し、その際の TGR5 の mRNA 発現量を Real Time RT-PCR 法を用いて測定した。その結果、フラボノイドの一種で、抗炎症作用及び抗がん作用を持つルテオリンが TGR5 の mRNA 発現を上昇させた。さらに、ルテオリンによる TGR5 の mRNA 発現上昇はガン抑制機能を持つ転写因子 p53 の阻害剤及び細胞増殖に関わる ERK 経路の阻害剤により抑制された。さらに、p53 に関して解析を進めるために、hTGR5 プロモーター領域の下流にルシフェラーゼ遺伝子を挿入したレポータープラスミドを作製した。これをヒト腎臓由来細胞 HEK293T 細胞へトランスフェクションし、レポーターアッセイにより、p53 による TGR5 プロモーターの活性変動を評価した。その結果、p53 は hTGR5 プロモーター領域に結合することが示唆され、現在はさらなる結合領域の絞り込みを行っている。
【考察】
ルテオリンによる TGR5 の発現制御には p53 と ERK が関わることが示唆され、これまでに報告されているルテオリンによる抗炎症作用及び抗がん作用が p53 と ERK 経路を介した TGR5 の発現上昇によって説明できることが示唆された。将来的に、食品成分により TGR5 の発現上昇を導き、疾病発症の予防に貢献することが期待される。

TGR5, liver, p53

講演番号：3A01a08
講演日時：3 月 19 日 11:15～ A 校舎 01 会場

# Tmem100 の発現制御機構解析

# The analysis of Tmem100 expression mechanism

○久保山 文音[1]、佐々木 崇[2]、清水 誠[2]、井上 順[2]、佐藤 隆一郎[2] ([1]東大農、[2]東大院農生科・応生化)
○Ayane KUBOYAMA[1], Takashi SASAKI[2], Makoto SHIMIZU[2], Jun INOUE[2], Ryuichiro SATO[2] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Grad. Sch. of Agri. and Life Sci.)

【研究の背景と目的】胆汁酸をリガンドとする G タンパク質共役受容体 TGR5 は、活性化により抗肥満効果や糖代謝改善効果をもたらすことが知られている。我々はこれまで骨格筋 TGR5 に着目し機能解析を進めてきたが、その過程で骨格筋における Tmem100 遺伝子の発現が TGR5 トランスジェニックマウスで上昇し、TGR5 ノックアウトマウスで低下していることを発見した。Tmem100 は 134 アミノ酸からなる、脊椎動物によく保存された 2 回膜貫通型タンパク質である。発現が確認されている組織は骨格筋や脳、肺など幅広く、近年は神経細胞における痛みのシグナル伝達や血管の分化・形態形成に不可欠な因子であることが報告されている。このように Tmem100 は生体内での重要な働きが期待されるにもかかわらず、研究例が極めて少なく、その発現制御や機能の発揮に関わる経路のほとんどは不明である。そこで本研究では、Tmem100 の新たな発現調節機構の解明を試みた。

【方法と結果】Tmem100 が発現調節作用を受ける条件を探索するために培養細胞を用いて複数の検討を行ったところ、小胞体ストレスを誘導した場合に Tmem100 の発現が上昇することを新たに見出した。そこで、マウス Tmem100 プロモーター領域の下流にルシフェラーゼ（luc）遺伝子を挿入したレポータープラスミドと小胞体ストレス応答性転写因子の発現プラスミドを HEK293T 細胞にコトランスフェクションし、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、数種類の転写因子のうち活性型 ATF6α のみが Tmem100 のプロモーター活性を亢進することが明らかとなった。さらに、luc プラスミドに組み込む Tmem100 プロモーターを段階的に削って重要な領域を絞り込み、発現制御への寄与が推測された特定の配列に変異を導入することで ATF6α 結合領域を推定した。

【考察】ルシフェラーゼアッセイの結果、Tmem100 の発現が ATF6α 特異的な小胞体ストレス応答経路によって調節されることが明らかになった。様々な疾患との関連が指摘される小胞体ストレスに対する応答は、生体にとって必須の機能と考えられている。そのような経路の一部で発現制御を受けるという事実は、Tmem100 が正常な生体機能を維持するうえで重要な役割を担うことを強く示唆する。本研究で得られた知見をもとに Tmem100 の研究をさらに発展させることで、骨格筋における TGR5 および ATF6α との関係性が示されるとともに、様々な組織に発現する Tmem100 の新たな機能の解明につながるものと期待される。

tmem100, er stress, atf6α

講演番号：3A01a09
講演日時：3 月 19 日 11:30～ A 校舎 01 会場

病態マーカーとしての脂肪酸アミド化合物の解析
Analysis of fatty acid amides as biomarkers
○岡本 拓也[1]、柴田 貴広[1]、吉武 淳[2]、内田 浩二[1,3]([1]名大院・生命農、[2]名大・未来社会、[3]東大院・農生科)
○Takuya OKAMOTO[1], Takahiro SIBATA[1], Jun YOSHITAKE[2], Koji UCHIDA[1,3] ([1]Grad.sch.of Bioagric. Sci. Nagoya Univ., [2]Institute for Innovation for Future Society, Nagoya Univ., [3]Grad.sch.of Agiric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo)

《背景・目的》
脂質は、細胞膜の主要な構成成分やエネルギー源としての役割を持つ重要な生体分子である。一方で脂質は酵素による反応、もしくは酸化によって脂質メディエーターへと変換されることが知られている。近年、長鎖脂肪酸のアシル化物が様々な生理活性を有することが報告されていることから、新規脂質メディエーターとして脂肪酸アシル化物が注目されている。中でも、脂肪酸アミドは睡眠調節、鎮痛、食欲調節など様々な生理作用を有し、生命活動に大きな影響を与える内因性分子として知られている。そこで本研究では、脂肪酸アミド化合物に着目し、質量分析装置を用いた検出・定量法の確立及び生体サンプルに含まれる脂肪酸アミド類の検出・定量を行った。また、LPS を腹腔内投与し全身性の炎症を起こしたマウスとそのコントロールマウスにおいて経時的に血漿中の脂肪酸アミド類の比較を行った。
《方法・結果》
8 種類の脂肪酸アミドの標品について、LC-MS/MS を用いた検出法を確立した。また、生体サンプルについてはリポ多糖(LPS)を balb/c マウスの腹腔内に投与 24 時間後に血漿・臓器を採取した。血漿・臓器から有機溶媒により脂質を抽出後、固相抽出したものをサンプルとして脂肪酸アミドの検出を行った。その結果、検出された脂肪酸アミド類の中でもオレイン酸のアミド誘導体であるオレイン酸アミド(オレアミド)の血漿中濃度がコントロールマウスと比較して減少する傾向が認められた。次にオレイン酸の安定同位体標識物からオレアミドの内部標準物質を作製し安定同位体希釈法による定量法を行った。その結果、腹腔内に LPS を投与したマウスの血漿中オレアミド濃度は、LPS 非投与群と比較して有意に減少することが明らかとなった。LPS 投与後の経時的な血漿中オレアミド濃度を測定したところ、投与後 1 時間後から 4 時間後までオレアミド濃度が一過的に減少し、その後投与前濃度まで回復する傾向が見られた。現在オレアミドの合成・分解を行うと考えられる酵素(PAM および FAAH)の臓器における発現量について解析を進めている。

Biomarker, Fatty acid amide, mass spectrometry

講演番号：3A01a10
講演日時：3 月 19 日 11:45～ A 校舎 01 会場

# アデノシンの構成物質と代謝産物が血糖値に与える影響

Effect of components and metabolites of adenosine on blood glucose levels

○鳥羽 裕太郎、沼田 綺葉、田尻 彩音、清水 誠、服部 一夫、只石 幹（東農大・応生科・栄養）
○Yutaro TORIBA, Ayaha NUMATA, Ayane TAJIRI, Makoto SHIMIZU, Kazuo HATTORI, Miki TADAISHI (Tokyo University of Agriculture)

【目的】アデノシンはアデニンとリボースからなるプリンヌクレオシドの一種である。また、アデノシンは細胞内外において、イノシンやアデノシン一リン酸（AMP)に代謝される。これまでに我々は、アデノシンをマウスに皮下投与すると、肝臓グリコーゲンの分解を介して血糖値を増加させることを見出した。一方で、アデノシンを構成するアデニンもしくリボースの分子構造が作用する可能性や、イノシン及び AMP 等の代謝産物が血糖値の増加に関与する可能性が推測される。そこで、本研究では実験 1 としてアデノシンを構成する物質、実験 2 ではアデノシンの代謝産物が血糖値に与える影響について比較検討した。
【方法】実験には 8-10 週齢雄性 C57BL/6J マウスを用いた。実験 1 では PBS、アデノシン、アデニン、リボース、アデニン＋リボースをそれぞれ皮下投与した。実験 2 では PBS、アデノシン、イノシン、AMP をそれぞれ投与した。アデニン、リボース、イノシン、AMP はそれぞれアデノシンと体重あたり等モル量を投与した。そして、投与前(Pre)と投与後 30、60、90 分において尾静脈から採血し血糖値を測定した。
【結果・考察】実験 1 では、投与 30 分後において PBS、アデニン、リボース、アデニン＋リボースに対してアデノシンで有意に血糖値が増加した。また、Pre から投与 90 分後までの血糖値の経時的な変化における Area under the curve（AUC)は PBS、アデニン、リボース、アデニン＋リボースに対してアデノシンで有意に増加した。これらのことから、アデノシンによる血糖値増加作用はアデニンやリボースではなくアデノシンの構造に起因することが示唆された。実験 2 では、投与 30 分後において PBS、イノシンに対してアデノシン、AMP で有意に血糖値が増加した。この血糖値の経時的な変化における AUC は、PBS、イノシンに対してアデノシン、AMP で有意に増加した。これらのことより、分子中にアデノシン骨格を持つ AMP も血糖値増加作用を有する可能性が示唆された。以上のことより、アデノシンの血糖値増加作用にはアデノシン骨格が必要であることが示された。

Adenosine, Adenosine metabolites, Blood glucose levels

講演番号：3A01p01
講演日時：3 月 19 日 14:00～ A 校舎 01 会場

タンパク質欠乏による血中ビタミン E 濃度低下機構
Mechanisms for the decrease in plasma alpha-tocopherol under protein deficiency.
○佐藤 遼太[1]、日野 美佳[1]、長田 恭一[2]、川端 博秋[2]、林 洪太[1]、竹中 麻子[2] ([1]明大院農、[2]明大農)
○Ryota SATOH[1], Mika Hino[1], Kyoichi Osada[2], Hiroaki Kawabata[2], Kota Hayasi[1], Asako Takenaka[2] ([1]Graduate School of Agriculture, Meiji Univ., [2]School of Agriculture, Meiji Univ.)

【背景・目的】
ビタミン E（α-tocopherol, α-toc）は体内の主要な脂溶性抗酸化物質である。タンパク質欠乏時には血中α-toc 濃度が低下して体内抗酸化力の低下を引き起こすが、α-toc 濃度の低下機構は明らかにされていない。α-toc の吸収や体内輸送には脂質トランスポーター（NPC1L1、SR-BI、ABCA1、MDR2 等）が関与し、肝臓から血中・末梢臓器への移行には輸送タンパク質（α-TTP）が必要であることが報告されている。そこで本研究では、タンパク質欠乏時のα-toc 吸収および体内輸送関連因子の変化を測定し、血中α-toc 濃度低下機構を解析した。
【方法】
5 週齢の Wistar 系雄性ラットにカゼインを 20%含む対照食（CON）、4%あるいは 5%含む低タンパク質食（LP）を 7 日間給餌した。肝臓、血中、各リポタンパク質画分、末梢臓器(大脳、小脳、副腎、脾臓、肺)、糞、胆汁のα-toc 濃度、肝臓α-TTP、SR-BI、ABCA1 の mRNA 量とタンパク質量、小腸 NPC1L1 および SR-BI の mRNA 量とタンパク質量を測定した。さらに、以下の実験により NPC1L1 による小腸からのα-toc 吸収の寄与を検討した。5 週齢の Wistar 系雄性ラットに CON あるいは LP、それぞれに NPC1L1 阻害剤である Ezetimibe（Ezt）を 0.008%添加した飼料を 7 日間給餌し、肝臓、血漿、糞中α-toc 濃度と脂質濃度、小腸 NPC1L1 および SR-BI mRNA 量、肝臓 MDR2 mRNA 量を測定した。
【結果･考察】
LP 摂取によって血中および臓器中のα-toc 濃度が有意に低下したが、肝臓α-TTP mRNA 量およびタンパク質量に変化はなかった。一方、糞中α-toc 排泄量が LP 摂取により有意に増加したことから、血中α-toc 濃度低下の原因は、α-TTP による輸送活性の低下ではなく糞中排泄の増加であると考えられた。LP 摂取による糞中α-toc 排泄量増加は Ezt の影響を受けず、NPC1L1 によるα-toc 吸収の低下が糞中排泄量増加の原因ではないことが示された。α-toc の胆汁への排泄に関わる肝臓 MDR2 の mRNA 量が LP 摂取によって有意に増加したが、胆汁α-toc 濃度は LP 摂取の影響を受けなかった。一方、小腸 SR-BI 量が小腸上部、中部において LP 摂取により低下することが明らかになった。以上の結果から、タンパク質欠乏時には小腸上中部 SR-BI を介したα-toc 吸収が低下して糞中排泄量が増加し、これにより血中α-toc 濃度が低下する可能性が示された。

α-tocopherol, protein deficiency, SR-BI

発表責任者：竹中麻子（takenaka@meiji.ac.jp）

講演番号：3A01p02
講演日時：3 月 19 日 14:15～ A 校舎 01 会場

卵巣摘出ラットの肝臓におけるオートファジーの変動
Change of hepatic autophagy in OVX rats
○金沢 匠（千葉県立保健医療大栄養）
○Takumi KANAZAWA (Chiba Pref. Univ.)

【目的】細胞内タンパク質分解機構の 1 つであるオートファジーは、体タンパク質の恒常性維持に働いている。またその一方で、絶食時には活発に誘導され、栄養飢餓時のアミノ酸供給源としての役割もあり、アミノ酸やインスリン等により調節されることが知られている。更年期障害モデルである卵巣摘出（OVX）ラットでは卵巣ホルモンの分泌低下による脂質代謝や骨代謝異常が報告されているが、たんぱく質代謝を担うオートファジーに関する報告は少ない。そこで本研究では、OVX ラットにおける肝臓オートファジーの変動と卵巣ホルモンによるオートファジー調節について検討した。
【方法】実験 1：卵巣摘出手術を施し 3 週間経過した 8 週齢の OVX ラットを摂食群及び 24 時間絶食群に分けて肝臓を採取した。得られた臓器からオートファジーマーカータンパク質である LC3 をウェスタンブロット法により検出した。LC3 には細胞質型の LC3-Ⅰとオートファゴソーム膜結合型の LC3-Ⅱがあり、LC3-Ⅱ量をオートファジー活性の指標とした。また、卵巣摘出のオートファジーへの影響を検討するため、対照群として偽手術（Sham）ラットの肝臓も採取し LC3 の検出を行った。
実験 2：実験 1 と同様に卵巣摘出後 3 週間経過した OVX ラットを摂食及び 24 時間絶食条件下においてそれぞれコントロール群（OVX）、エストラジオール投与群（OVX-E2）、プロゲステロン投与群（OVX-P4）に分け、溶媒または卵巣ホルモンを投与した。ホルモン投与 2 時間後に肝臓を採取し、LC3 の検出を行った。また、実験 1 と同様に卵巣摘出処理に対する対照群には Sham ラットを用いた。
【結果および考察】実験 1：OVX 群の肝臓での LC3-Ⅱ量を Sham 群と比較すると、摂食・絶食時ともに OVX 群で減少し、卵巣摘出による肝臓オートファジーの抑制が見られた。この減少は絶食時において特に顕著であった。
実験 2：OVX ラットにおける卵巣ホルモン投与の効果について検討した結果、卵巣ホルモン投与（OVX-E2、OVX-P4）群の肝臓では LC3-Ⅱ量が減少し、オートファジーに対する抑制作用を示した。
ラットに卵巣摘出処理を施し 3 週間経過したラットでは、肝臓のオートファジーが抑制されていることが示唆された。そこで、実験 2 において卵巣ホルモンのオートファジーに対する作用を検討したところ、卵巣ホルモンは肝臓のオートファジーに対して抑制的に働くことが示唆された。従って、卵巣ホルモンの分泌が低下した OVX ラットの肝臓ではオートファジーの低下が見られるが、卵巣ホルモンが肝臓オートファジーに対して抑制的な調節作用を示したことから、このオートファジーの変動は卵巣ホルモンの減少が直接の原因ではないと考えられる。

autophagy, OVX rats, LC3

発表責任者：金沢匠（takumi.kanazawa@cpuhs.ac.jp）

講演番号：3A01p03
講演日時：3 月 19 日 14:30～ A 校舎 01 会場

# 線虫を用いた繰り返し絶食が生体に及ぼす影響の検討

Analysis of repeated-starvation effect using C. elegans.

○松本 晋也、山本 玲奈、山本 佳苗、長尾 美咲、佐藤 奈央、山本 さゆり、澤永 朱里 (京女大食物栄養)
○Shinya MATSUMOTO, Rena YAMAMOTO, Kanae YAMAMOTO, Misaki NAGAO, Nao SATO, Sayuri YAMAMOTO, Akari SAWANAGA (Kyoto Women's Univ)

生活の多様化やダイエット志向などにより，習慣的な欠食や過度なダイエットの繰り返しに曝されている人は少なくない。なかでも，ダイエットの繰り返しは，程度の差こそあれ若い女性の多くが体験していると考えられ，このような体験が生体にどのような影響を与えるかは分かっていない。そこで，我々は線虫 *Caenorhabditis elegans* を用いて繰り返し絶食が生体に与える影響を分子生物学的に解析した。

【方法】成虫線虫に 6 時間絶食-18 時間給餌のサイクルを 2 回施して繰り返し絶食を経験させたのち，脂溶性蛍光試薬 NileRed を用いた画像解析法，及び生化学的脂肪定量法を使ってこれら線虫の脂肪蓄積量を解析した。また，脂肪合成系遺伝子（アセチル CoA カルボキシラーゼ，脂肪酸シンターゼ，ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ)，脂肪分解系遺伝子（ホルモン感受性リパーゼ，カルニチンアシルトランスフェラーゼ，チオラーゼ）の発現量を real time RT-PCR で解析した。

【結果】NileRed による蛍光画像解析から，繰り返し絶食を経験した線虫では脂肪蓄積量が増加していることが見いだされた。この結果は，線虫から脂肪を抽出し，生化学的手法で定量した解析からも支持された。さらに，繰り返し絶食を経験した線虫の脂肪代謝関連遺伝子の発現解析では，脂肪合成に関わる遺伝子群に大きな発現変動は認められなかったが，脂肪分解に関わる遺伝子群については発現が減少しているものが認められた。遺伝子発現解析結果は，絶食を経験した線虫において脂肪蓄積量が増加しているという画像解析，生化学的解析結果と矛盾しないと考えられる。繰り返し絶食を経験した線虫の運動能力，寿命には差は認められなかった。

【考察】繰り返し絶食を経験した線虫の運動能力と寿命に影響が認められなかったことから，繰り返し絶食が生存を左右するような直接的な影響を及ぼすわけではないことが示唆された。一方，脂肪蓄積量が増えているという結果から，太りやすい体質に変化した可能性が考えられる。このような体質変化を引き起こすメカニズムとしてエピジェニティクスが考えられる。この仮説を裏付けるため，繰り返し絶食を体験した線虫のヒストン修飾の変化を解析する予定である。

Caenorhabditis elegans, starvation, epigenetics

発表責任者：松本晋也（matumots@kyoto-wu.ac.jp）

講演番号：3A01p04
講演日時：3 月 19 日 14:45～ A 校舎 01 会場

プロスタグランジン $D_2$ に由来する脂質メディエーターの解析
Identification of a prostaglandin $D_2$-derived lipid mediator
○犬塚 恵美[1]、柴田 貴広[1]、内田 浩二[1,2]（[1]名大院・生命農、[2]東大院・農生科）
○Emi Inuzuka[1], Takahiro Shibata[1], Koji Uchida[1,2] ([1]Grad. Sch. of Bioagric. Sci. Nagoya Univ, [2]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】

脂質は細胞膜の主要な構成成分やエネルギー源として重要な役割を果たすほか、脂質メディエーターと呼ばれる様々な一連の生理活性脂質に変換されて、生体防御や神経伝達などに関与する。中でもプロスタグランジン（PG）は、外界からの刺激に応答してアラキドン酸より生成される重要な脂質メディエーターである。主要な PG のひとつであるプロスタグランジン $D_2$ ($PGD_2$) は、血小板凝集抑制や睡眠の誘発、アレルギー性炎症に関与する一方で、それ自身が非酵素的な脱水を受け、様々な PG へと変換される。$PGD_2$ から生成される $J_2$ 型 PG はシクロペンテノン構造を有し、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体γ (PPARγ) のリガンドになるなど、ユニークな生理活性を有することが知られている。しかし、$PGD_2$ の変換経路についてはいまだ不明な点が多く残っており、生体内での代謝、およびその産物の生物学的意義は明らかではない。そこで本研究では質量分析装置を用いた $PGD_2$ 変換経路の詳細な検討、および培養細胞における PG の産生について解析し、PG の生理活性の更なる解明を目的として研究を行った。

【方法・結果】

$PGD_2$ およびその変換産物を LC-MS/MS のプロダクトイオンスキャンモードで解析したところ、検討したすべての PG において共通のプロダクトイオンが検出された。このことから共通のプロダクトイオンを検出する方法により、$PGD_2$ の変換産物を選択的に検出することとした。*in vitro* における検討の結果、血清アルブミンの存在下において $PGD_2$ より新規生成物が産生されることが明らかとなった。UV 吸収スペクトル測定や高分解能 MS 測定、NMR 解析により、新規生成物は $\Delta^{12}$-$PGD_2$ であることが明らかとなった。LC-MS/MS を用いた定量解析を行ったところ、血清アルブミン濃度依存的に $\Delta^{12}$-$PGD_2$ の生成量が増加した。また $\Delta^{12}$-$PGD_2$ それ自身はほとんど変換されないことが明らかとなり、$\Delta^{12}$-$PGD_2$ は $PGD_2$ の最終産物の一つであることが予想された。続いてラット肥満細胞株である RBL-2H3 細胞を用いて $\Delta^{12}$-$PGD_2$ の検出を試みたところ、抗原/抗体刺激をした肥満細胞培養上清から $\Delta^{12}$-$PGD_2$ が検出された。さらにその産生は COX 阻害剤の添加によって完全に抑えられた。また、ルシフェラーゼアッセイを用いたリガンド活性評価により、$\Delta^{12}$-$PGD_2$ は PPARγを活性化することが示唆された。

Prostaglandin, LC-MS/MS, lipid mediator

講演番号：3A01p05
講演日時：3 月 19 日 15:00～ A 校舎 01 会場

# 食品由来 TRPM8 アゴニスト胃内投与による体温変化の作用機序の検討

# Mechanisms of changes in body temperature by intragastric administration of TRPM8 agonists from foods

○森 紀之、浦田 朋実、福渡 努（滋賀県大人間文化）
○Noriyuki MORI, Tomomi URATA, Tsutomu FUKUWATARI (Univ. of Shiga Pref.)

【背景と目的】 Transient Receptor Potential（TRP）チャネルは非選択性陽イオンチャネルであり、さまざまな生理的役割を有することが報告されている。TRP チャネルの一員である TRPM8 は 25℃以下の低温刺激により活性化し、興味深いことにメントールや 1,8-シネオールなどの食品成分によっても活性化することが明らかになっている。TRPM8 は感覚神経終末などに発現すること、さらに皮膚感覚神経に発現する TRPM8 は冷刺激に対する体温調節反応に寄与することが報告されている。当研究室ではこれまで、TRPM8 アゴニストとなる食品成分の胃内投与がマウスにおいて TRPM8 の活性化温度域に応じた体温調節反応を惹起すること、さらにそれは TRPM8 を介した反応であることを明らかにしてきた。しかしながら、TRPM8 アゴニストが生体内のどこで TRPM8 に作用するのか不明であった。TRPM8 は感覚神経節だけではなく、迷走神経節でも発現が確認されており、消化管内に発現する TRPM8 が体温調節反応の惹起に関与する可能性が考えられる。そこで本研究は、胃内投与された TRPM8 アゴニストが、消化管内で TRPM8 に作用し体温調節反応を惹起する可能性を明らかにすることを目的とした。
【方法】 実験動物には C57BL/6J マウス♂、7 週齢を用いた。マウスを 2 時間絶食させた後、ウレタン（1.4g/kg）で麻酔した。熱産生、熱放散、深部体温の指標として肩甲骨間褐色脂肪組織周囲（IBAT）、尻尾の皮膚血管周囲、直腸の 3 カ所の体温変化をそれぞれ測定し、体温調節反応を評価した。マウスを恒温槽に入れ体温を安定させた後、カニューレを用いて胃内または頚静脈内に試料投与し、投与後 180 分間の各部位の温度変化を測定した。投与試料として、TRPM8 アゴニストとなるユーカリやローズマリーの香気成分である 1,8-シネオール（胃内：100 mg/kg、静脈内：10 mg/kg）を用いた。また、迷走神経の関与を検討するため、横隔膜直下で迷走神経切除を行ったマウスを実験に用いた。
【結果と考察】 1,8-シネオールの胃内投与により、IBAT 温、直腸温が上昇した。迷走神経切除マウスでは、1,8-シネオールの胃内投与により直腸温は上昇したものの、その変化量は偽手術マウスに比して低値となった。また 1,8-シネオールの静脈投与により、マウスの IBAT 温、直腸温が上昇した。以上の結果から、1,8-シネオールの胃内投与による体温調節反応の惹起には、迷走神経が一部関与することが考えられ、消化管内での TRPM8 への作用が体温調節反応の惹起に寄与する可能性が考えられた。また 1,8-シネオールは消化管内だけではなく、吸収後にも作用点を有することが考えられた。現在、1,8-シネオールの静脈投与により惹起された体温調節反応が TRPM8 を介した反応であるか明らかにするため、TRPM8 アンタゴニストを用いた検討を進めている。

TRPM8, thermoregulation, mice

講演番号：3A01p06
講演日時：3 月 19 日 15:25～ A 校舎 01 会場

分子内 FRET を用いたヒト多剤排出ポンプ(MDR1, ABCB1)の構造変化解析手法の確立
Analysis of confomational changes of multidrug transorter(MDR1, ABCB1) by intramolecular FRET

○二股 良太[1]、小笠原 史彦[1]、市川 尚文[1]、木村 泰久[1]、木岡 紀幸[1]、植田 和光[1,2] ([1]京大院農、[2]京大・iCeMS)
○RYOTA FUTAMATA[1], FUMIHIKO OGASAWARA[1], TAKAFUMI ICHIKAWA[1], YASUHISA KIMURA[1], NORIYUKI KIOKA[1], KAZUMITSU UEDA[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agri., Kyoto Univ., [2]iCeMS, Kyoto Univ.)

【背景・目的】

多剤排出ポンプ(MDR1, ABCB1)は、腸管や腎臓、肝臓の細胞膜上で生体内異物を細胞外へ排出する役割を担っている。また、抗がん剤に対する多剤耐性の獲得に関与しているため、がん治療の標的分子として重要である。ABCB1 は 12 回膜貫通タンパク質であり、細胞質側に 2 つの ATP 結合領域(NBD)を持つ。ABCB1 は 2 つの NBD が解離した構造で安定であるが、2 つの NBD が ATP 結合を伴った会合と加水分解後の解離を繰り返し、それによって分子全体が構造変化することで基質を輸送する。これまでに、精製タンパク質を用いて ABCB1 の構造変化を評価する実験系は報告されたが、生細胞を用いてリアルタイムに構造変化を観察した報告はない。本研究では、2 つの NBD の後ろに 2 種類の蛍光タンパク質を融合させ、分子内蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)によって 2 つの NBD 間の距離の変化を検出し、生細胞系で ABCB1 の構造変化を直接評価できる実験系を確立することを目的とした。

【方法・結果】

まず、ABCB1 の 2 つの NBD の後ろにそれぞれ cerulean、venus を挿入した Two-color ABCB1 と、ポジティブコントロールとして ABCB1 の C 末端に venus と cerulean を連続して融合した ABCB1-Tandem を作製し、正常に細胞膜に局在すること、基質排出活性を保持していることを確認した。次に、それぞれの ABCB1 を HEK293 細胞で一過的に発現させて共焦点顕微鏡を用いて FRET シグナルを測定し、画像解析ソフト ImageJ を用いて細胞膜上に局在する ABCB1 の FRET 効率を算出した。その結果、Two-color ABCB1 では ABCB1-Tandem の約 7 割の FRET 効率が得られた。また、輸送基質である verapamil で活性を誘導すると、ABCB1-Tandem と同程度まで FRET 効率が上昇することを見出した。この結果から、ABCB1 の構造変化を分子内 FRET で評価できることが示された。さらに、verapamil の濃度を変化させたときの FRET 効率の変動パターンは、既報の精製タンパク質を用いた ATP 加水分解活性測定実験における verapamil の濃度に依存した活性の変動パターンと類似していた。これらの結果から、生細胞を用いて ABCB1 の構造変化をリアルタイムに評価する実験系を確立できたと考えている。現在、この実験系を用いて様々な条件における ABCB1 の構造変化を検討している。

ABC protein, MDR1, FRET

発表責任者：植田　和光（uedak@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3A01p07
講演日時：3 月 19 日 15:40～ A 校舎 01 会場

# ABCA1 と apoA-I によるコレステロール排出メカニズム解明への新しい定量的アプローチ

# A new quantitative approach to revealing the lipid efflux mechanism by ABCA1 and apoA-I

○三好 里奈[1]、小笠原 史彦[1]、石神 正人[1]、永田 紅[1,2]、木村 泰久[1]、木岡 紀幸[1]、植田 和光[1,2] ([1]京大院農・応用生命科学、[2]京大 iCeMS)
○Rina Miyoshi[1], Fumihiko Ogasawara[1], Masato Ishigami[1], Koh Nagata[1,2], Yasuhisa Kimura[1], Noriyuki Kioka[1], Kazumitsu Ueda[1,2] ([1]Div.Appl.Life Sci., Grad.Sch. of Agric., Kyoto Univ., [2]iCeMS, Kyoto univ.)

【背景・目的】

ATP-binding cassette transporter A1(ABCA1)は善玉コレステロール(HDL)産生に必須の脂質輸送体であり、細胞内に過剰に蓄積したコレステロールをリン脂質と共に血中のアポリポプロテイン A-I（apoA-I）に受け渡すことで HDL を産生する。ABCA1 による HDL 産生は、コレステロールを末梢細胞から肝臓へ逆輸送する唯一の経路であり、動脈硬化の予防に大きく貢献する。しかし、HDL 産生において ABCA1 がどのように apoA-I に脂質を受け渡しているのかについては議論が分かれており、その詳細は未だ解明されていない。従来、ABCA1 と apoA-I による脂質排出は、ABCA1 を発現させた細胞を apoA-I と共に 24, 48 時間といった長時間培養した際の脂質排出活性で評価されてきた。しかし、この条件では、ABCA1－apoA-I 間の直接相互作用など、脂質排出の詳細なメカニズムを解析することができない。本研究では、ABCA1 を発現させた細胞と apoA-I を短時間反応させた際の脂質排出量を測定することで、ABCA1 による脂質排出の初速を定量的に解析した。これによって ABCA1 と apoA-I によるコレステロール排出メカニズムを解明することを目的とした。

【方法・結果】

まず、ABCA1 を誘導発現できる BHK/ABCA1 株を用いて apoA-I 依存的なコレステロール排出を測定したところ、反応時間 1 時間までコレステロール排出量は直線的に増加することが分かった。次に、$^{3}$H-コレステロールを細胞に取り込ませることによって、反応時間 1 時間での脂質排出活性を感度良く測定できる系を確立した。次に、この系を用いて 0~40 μg/mL の apoA-I を細胞に添加し、ABCA1 によるコレステロール排出活性の apoA-I 濃度依存性を評価した。その結果、ABCA1 は添加した apoA-I 濃度に依存したコレステロール排出活性を示した。さらに、コレステロール排出活性と apoA-I 濃度の関係はシグモイド曲線で表され、曲線回帰を行ったところ Hill 係数 n=1.8 で表される Hill 式に回帰した。Hill 係数は酵素反応における協同性の指標とされることから、ABCA1 と apoA-I による脂質排出には何らかの正の協同性が働いていることが明らかになった。当研究室ではこれまでに、ABCA1 は HDL 産生過程において一時的に細胞膜上で二量体化することを明らかにしている。このことから、本研究で明らかになった脂質排出における正の協同性には、ABCA1 の二量体化が関与すると考えた。現在、この仮説の検証を進めている。

ABCA1, cholesterol, HDL

講演番号：3A01p08
講演日時：3 月 19 日 15:55～ A 校舎 01 会場

# ヒト ABCB6 によるポルフィリン認識機構の解析

# Analysis of porphyrin recognition mechanism by human ABCB6

○西澤 奈美[1]、木村 泰久[1]、大貫 元[1]、木岡 紀之[1]、植田 和光[1,2] ([1]京大院・農・応用生命、[2]京大・iCeMS)
○Nami NISHIZAWA[1], Yasuhisa KIMURA[1], Hajime OHNUKI[1], Noriyuki KIOKA[1], Kazumitsu UEDA[1,2] ([1]Div.Appl.Life Sci., Grad.Sch.of Agri., Kyoto Univ, [2]iCeMS., Kyoto Univ)

【背景・目的】ポルフィリン化合物は細胞内の様々な活動に重要な補因子であり、代表的なものとして酸素の運搬やミトコンドリアでの電子伝達に関与するヘムが良く知られている。また過剰のポルフィリンは細胞毒性を示すため、ポルフィリン恒常性維持は細胞にとって重要である。先行研究により ABCB6 と呼ばれる輸送体が細胞内のポルフィリン恒常性維持に関与することが示唆された。ABCB6 は ATP 結合、加水分解エネルギーを利用して基質を輸送する ABC タンパク質で、ミトコンドリア外膜に局在し、ポルフィリン化合物をミトコンドリア内に輸送することで、ヘム生合成に重要な役割を果たすと考えられてきた。一方で、リソソームへの局在や多剤輸送体としての可能性も示唆され、その機能や局在についてはまだ謎が多い。また、ABCB6 がどのような構造のポルフィリンを認識して輸送するかは不明であり、認識機構を明らかにできれば生理機能の解明に大きく貢献すると期待できる。ABCB6 によるポルフィリン化合物の認識に関しては、先行研究からポルフィリンの環構造が必要であることが示唆されている。そこで本研究ではポルフィリン環の周辺構造に着目し、ABCB6 がポルフィリン化合物を基質として認識する際にどのような構造が重要であるか明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】浮遊状態で培養可能な HEK293 細胞(FreeStyle293-F 細胞)を用いて、C 末側に FLAG タグを導入した ABCB6 を発現させた。発現細胞を界面活性剤(0.8% DDM)で可溶化し、抗 FLAG 抗体を用いて ABCB6 を精製した。1 L 培養あたりの精製標品の収量は約 190 μg であり、銀染色によって確認された精製標品の純度は約 84%であった。ABC タンパク質の ATP 加水分解活性は輸送基質によって促進されることが多い。そこで本研究ではリポソーム再構成標品の ATP 加水分解活性を指標としてポルフィリン化合物との相互作用を評価した。まずポルフィリン環周囲のカルボキシル基の有無について検討を行ったところ、ポルフィリン環の周囲にカルボキシル基を持つ化合物のみが濃度依存的に活性を上昇させることが明らかとなった。次いでポルフィリン環周辺部のカルボキシル基数が異なる化合物について検討を行った。4 つまたは 1 つのカルボキシル基を持つ化合物は、活性を最大で 2 倍ほど上昇させたのに対して、カルボキシル基を持たない化合物では活性が全く上昇しなかった。また、カルボキシル基を 2 つ持つ化合物は ABCB6 の基質と考えられるものの活性を阻害した。以上の結果から、ABCB6 のポルフィリン化合物の認識にはカルボキシル基を少なくとも 1 つ持つことが必要であることが示唆された。

ABC transporter, porphyrin

講演番号：3A01p09
講演日時：3 月 19 日 16:10～ A 校舎 01 会場

# 網羅的探索により見出した N-ミリストイル化された多重回膜貫通タンパク質の解析

Analysis of N-myristoylated transmembrane proteins

○黄波戸 亜哉、松﨑 嘉奈子、守屋 康子、内海 俊彦（山口大創成科学）
○Aya KIWADO, Kanako MATSUZAKI, Koko MORIYA, Toshihiko UTSUMI (Yamaguchi Univ.)

**[目的]** 主要なタンパク質脂質修飾の一種であるタンパク質 N-ミリストイル化は、飽和脂肪酸であるミリスチン酸が、翻訳と共役してタンパク質 N 末端にアミド結合を介して結合する反応であり、一般に細胞質タンパク質に生ずることが知られている。我々はこれまでに、ヒト N-ミリストイル化タンパク質の網羅的探索の過程で、小胞体膜タンパク質 Lunapark やミトコンドリア外膜タンパク質 SAMM50 が N-ミリストイル化され、この修飾がオルガネラ形成やオルガネラへの局在に関与することを見出した。本研究では、膜タンパク質に起きる N-ミリストイル化が Lunapark と SAMM50 に生ずる例外的な修飾反応ではなく、多くの膜タンパク質に生ずる普遍的な修飾反応であるか否かを明らかにすることを目的として、ヒトタンパク質配列データベース SwissProt に収集された全ヒトタンパク質から N-ミリストイル化された多重回膜貫通タンパク質の探索を行った。

**[方法・結果]** SwissProt に収集された約 46,000 個のヒトタンパク質からこれまでの解析において見出した 171 個の新規 N-ミリストイル化タンパク質候補について UniProt を参照したところ、膜貫通タンパク質と予測されるタンパク質が 39 個含まれていた。これらの中には 1 回膜貫通タンパク質が多く含まれていたが、膜貫通領域を 2、3、4、6、7、10、11、12 個持つ多重回膜貫通タンパク質やβバレルタンパク質といった多様な膜結合領域を持つ膜貫通タンパク質が存在していた。これらの中から、若年性セロイドリポフスチン症の原因タンパク質である CLN3、プラスミノーゲンレセプター PLGRKT、有機カチオン輸送体 SLC29A4 という3つのタンパク質に注目し解析を行った。

C 末端に Flag-tag を付加した全長 cDNA を用いて、昆虫細胞由来無細胞タンパク質合成系及び遺伝子導入した COS-1 細胞における代謝標識実験により N-ミリストイル化を検討した結果、これらのタンパク質はすべて効率よく N-ミリストイル化されることが示された。また、免疫蛍光染色法により細胞内局在を検討した結果、6 回膜貫通型タンパク質である CLN3 は後期エンドソーム/リソソームに、2 回膜貫通型タンパク質である PLGRKT はミトコンドリアに、10 回膜貫通型タンパク質である SLC29A4 は細胞内顆粒にそれぞれ局在することが明らかになった。続いて、これらのタンパク質の小胞体膜通過の有無について、グリコシル化部位を導入した TNF をそれぞれのタンパク質の膜貫通領域の後ろに融合させた cDNA を用いて、遺伝子導入細胞におけるグリコシル化の有無により検討を行った。その結果、これらの3つタンパク質はいずれも、小胞体膜通過を生じておらず、通常の小胞輸送の経路とは異なる経路で各オルガネラ膜へと輸送されている可能性が示された。

以上の結果から、これまでに細胞質タンパク質に選択的に生ずると考えられてきたタンパク質 N-ミリストイル化は、種々の膜上トポロジーを持ち、多様な膜局在化機構により膜に局在する膜タンパク質にも生ずる翻訳後修飾であることが明らかになった。

N-myristoylation, transmembrane proteins, post-translational modification

講演番号：3A01p10
講演日時：3 月 19 日 16:25～ A 校舎 01 会場

新規リジン長鎖アシル化タンパク質 TEAD の機能解析
Functional analysis of TEAD transcription factors as novel lysine long-chain fatty acylated proteins

○則次 恒太[1,2]、伊藤 昭博[1,3]、工藤 紀雄[4]、鈴木 健裕[5]、堂前 直[5]、吉田 稔[1,2,3,4] ([1]理研・化学遺伝、[2]東大院・農生科・応生工、[3]理研・環境資源・ケミカルゲノミクス、[4]理研・環境資源・創薬シード、[5]理研・環境資源・生命分子解析)
○Kota NORITSUGU[1,2], Akihiro ITO[1,3], Norio KUDO[4], Suzuki TAKEHIRO[5], Naoshi DOHMAE[5], Minoru YOSHIDA[1,2,3,4] ([1]Chem. Genet. Lab., RIKEN, [2]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [3]Chem. Genomics, RIKEN CSRS, [4]Seed Cpds Explor. Unit Drug Discov., RIKEN CSRS, [5]Biomolec. Character. Unit, RIKEN CSRS)

NAD 依存的なリジン脱アセチル化酵素である Sirtuin は、ヒトでは 7 種類（SIRT1-7）存在し、代謝、老化などを制御することが知られている。最近、SIRT2 および SIRT6 が脱アセチル化酵素活性に加えて、脱長鎖アシル化活性を有していることが報告され、新たな翻訳後修飾としてリジン長鎖アシル化修飾が注目されているが、その基質となるリジン長鎖アシル化タンパク質はほとんど知られていない。そこで、質量分析法を用いたランダム修飾プロテオーム解析を行ったところ、がん抑制経路の一つである Hippo 経路で働く転写因子 TEAD の、異なるアイソフォームおよび種を超えて保存されているリジン残基がミリストイル化されていることを見出した。

TEAD は転写共役因子の YAP/TAZ と結合することで細胞増殖の促進やアポトーシス抑制に関わる遺伝子の発現を活性化させ、発生や細胞のがん化に寄与する。Hippo 経路の活性は、YAP/TAZ のリン酸化によって制御されていることが良く知られており、最近になって新たに TEAD のシステイン残基における自己パルミトイル化が YAP/TAZ との結合に重要であることが報告された。しかしながら TEAD のリジン残基における長鎖脂肪酸修飾を介した Hippo 経路の制御機構については全く知られていない。

そこで、本研究では TEAD のリジンミリストイル化修飾制御機構と TEAD のミリストイル化リジン修飾の生理的意義の解明を目的とした。始めに、大腸菌から精製したリコンビナント Sirtuin タンパク質を用い、TEAD 由来のミリストイル化修飾ペプチドを基質とした in vitro 脱アシル化アッセイを行ったところ、SIRT1, 2, 3 および 6 が脱アシル化活性を有していることを見出した。また、このミリストイル化リジンを特異的に認識するモノクローナル抗体を作製し、アシル化を受けるリジン残基をアルギニンに置換した変異体（KR 変異体）およびパルミトイル化を受けることが報告されたシステイン残基をセリンに置換した変異体（CS 変異体）の修飾状態を作製した抗体で解析したところ、KR 変異体に加えて CS 変異体もリジン残基のミリストイル化修飾が起こらなくなっていることを明らかにした。さらに報告された結晶構造中でこのシステイン残基はリジン残基と近接していることから、リジン残基のアシル化修飾はシステイン残基から分子内転移によって引き起こされていることが示唆された。加えて、KR 変異体は YAP との結合能が減少することを見出し、リジン残基の長鎖アシル化修飾が YAP との結合に重要であることが示唆された。本発表では、TEAD のリジン長鎖アシル化修飾を介した Hippo 経路の新しい活性制御機構について議論したい。

TEAD, Lysine acylation, Post-translational modifications

発表責任者：則次恒太（kota.noritsugu@riken.jp）

講演番号：3A01p11
講演日時：3 月 19 日 16:50～ A 校舎 01 会場

哺乳類の嗅覚系における膜貫通受容体 CD36 の発現
Expression of a transmembrane receptor CD36 in the mammalian olfactory system
○李 信恵[1]、江口 愛[1]、都築 巧[1]、松村 成暢[1]、井上 和生[1]、岩永 敏彦[2]、増田 大作[3]、山下 静也[3]、伏木 亨[4] ([1]京大院農、[2]北大院医、[3]阪大院医、[4]龍大農)
○Shinhye Lee[1], Ai Eguchi[1], Satoshi Tsuzuki[1], Shigenobu Matsumura[1], Kazuo Inoue[1], Toshihiko Iwanaga[2], Daisaku Masuda[3], Shizuya Yamashita[3], Tohru Fushiki[4] ([1]Kyoto Univ., [2]Hokkaido Univ., [3]Osaka Univ., [4]Ryukoku Univ.)

【背景・目的】 CD36 は小腸、肝臓、筋肉などで発現する膜貫通型受容体である。本受容体は酸化型リポタンパク質、酸化型リン脂質、長鎖脂肪酸等、様々なリガンドの認識と細胞内取り込みに関わると考えられている。一方、CD36 がげっ歯類の味蕾細胞にも発現し、口腔内において長鎖脂肪酸の感知に関わることが報告され、感覚センサーとしての機能も示唆されてきている。他の感覚器官に関しては、昆虫の CD36 ホモログが親油性フェロモンの嗅官感知に寄与するとの報告があるが、CD36 が哺乳類の嗅覚受容に関わるかについては不明である。本研究ではマウスを哺乳類動物モデルとし、匂い分子の感知部位である鼻粘膜における CD36 の発現と分布を検討することとした。
【結果・考察】 まず、逆転写–ポリメラーゼ鎖反応法、ウエスタンブロッティング法により、マウスの鼻粘膜における CD36 mRNA 及びタンパク質の存在を確認した。次に、嗅細胞マーカー蛋白質と CD36 の抗体を用いて二重免疫染色を行った結果、一部の嗅細胞で CD36 が発現していることが示された。また、免疫電子顕微鏡法により CD36 が嗅上皮表面の嗅毛と微絨毛に分布することが明らかになった。以上より、哺乳類の嗅覚システムにおいて CD36 が何らかの役割を果たすことが示唆された。

CD36, nasal epithelium, olfactory receptor cells

講演番号：3A01p12
講演日時：3 月 19 日 17:05～ A 校舎 01 会場

GATA2 によるマスト細胞プロテアーゼの発現制御機構
GATA2 regulates expression of mast cell protease in mast cells
○笠倉 和巳、中谷 光、新井 貴大、八代 拓也、西山 千春（東理大・基礎工）
○ Kazumi KASAKURA, Hikaru NAKAYA, Takahiro ARAI, Takuya YASHIRO, Chiharu NISHIYAMA (Tokyo Univ. of Sci)

【背景/目的】食物アレルギーに代表される I 型アレルギー炎症誘導において中心的な役割を果たすマスト細胞は、全身に広く分布し、存在する組織により大きく二つに分けられる。腸管などに存在する「粘膜型マスト細胞」と皮膚などに存在する「結合組織型マスト細胞」は、それぞれ発現するプロテアーゼが異なる。粘膜型マスト細胞に高発現するマスト細胞プロテアーゼ（MCPT）-1、2 は、TGF-β によりその発現が誘導されると報告されているが、その発現機構の分子メカニズムは明らかにされていない、そこで、本研究では、マスト細胞における TGF- βによる MCPT-1、2 の発現制御機構を明らかにすることを目的とした。
【方法/結果】マウス骨髄由来培養マスト細胞（BMMC）を TGF- β存在下で培養し、MCPT-1、2 の mRNA 量を経時的に測定した結果、TGF- β処理 2 時間後から有意な発現上昇がみられた。また、TGF- β シグナルに重要な分子である smad4 をノックダウンした BMMC では、TGF- β処理による発現上昇が見られないことを確認した。MCPT-1、2 はマスト細胞特異的なプロテアーゼであることから、これまでに我々が、マスト細胞において FcεRI や ST2 の発現制御因子として同定している GATA2 について、MCPT-1、2 発現への関与をノックダウン試験により確認した。GATA2 のノックダウンにより、TGF- β処理による MCPT-1、2 の発現上昇が顕著に抑制された。クロマチン免疫沈降法により MCPT-1、2 それぞれの転写開始点から約 3kbp 上流の GATA と smad の結合モチーフが存在する領域への GATA2 の結合量が TGF- β処理により増加することが判明した。そこで、GATA2 と smad 分子との相互作用を免疫沈降法により解析した。Myc タグ付加 smad2、HA タグ付加 smad4、Flag タグ付加 GATA2 の発現ベクターをヒト胎児由来腎臓上皮細胞株（293T）にトランスフェクションして過剰発現させた。TGF- β存在下または非存在下で培養した細胞から抽出した細胞溶解液を抗 Flag 抗体用いた免疫沈降に供し、共沈降したタンパク質をウエスタンブロットにより検出した。TGF- β処理により Flag-GATA2 と HA-smad4 の相互作用が確認された。以上のことから、TGF- β刺激により活性化した smad2 が smad4 と結合し、さらに smad4 と GATA2 が相互作用することにより、smad2-smad4-GATA2 複合体が形成され、核内に移行して、プロモーターに結合することで、MCPT-1、2 の転写活性化に寄与していることが示唆された。

mast cells, protease, GATA2

講演番号：3A01p13
講演日時：3 月 19 日 17:20～ A 校舎 01 会場

# 脂質異常症に関連した修飾血清アルブミン構造の解析

# Inflammatory responses induced by modified serum albumin

○中島 史恵[1]、柴田 貴広[1,2]、菊地 良介[3]、松下 正[3]、内田 浩二[1,4]（[1]名大院・生命農、[2]JST さきがけ、[3]名大・医・附属病院、[4]東大院・農生科）
○Fumie NAKASHIMA[1], Takahiro SHIBATA[1,2], Ryosuke KIKUCHI[3], Tadashi MATSUSHITA[3], Koji UCHIDA[1,4] ([1]Grad. Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ., [2]JST PRESTO, [3]Nagoya Univ. Hospital, [4]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】DNA から転写・翻訳されて合成されたタンパク質は、生体内で様々な翻訳後修飾を受けることが知られている。タンパク質の翻訳後修飾は分化や細胞増殖、細胞死等の生命活動の維持に関与することが広く知られているが、近年になって翻訳後修飾は生体の状態を反映していること明らかとなってきた。さらに、一部のタンパク質は翻訳後修飾を受けることによってリガンド活性を獲得し、疾病の発症や進展に関与することも報告されている。これまでに当研究室において、慢性疾患であるヒトアテローム動脈硬化病巣において血清アルブミン(HSA)の蓄積が起きていること、HSA 画分のマクロファージ細胞への投与によりシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) の発現を誘導することが確認されている。さらに、HSA による炎症誘導機構について解析を行った結果、特に酸化型血清アルブミン(oxHSA)が炎症誘導活性を有するとともに、脂質異常症患者血清において oxHSA の割合が増加することを明らかとしてきた。本大会では、oxHSA の機能性について解析した結果を報告する。
【方法・結果】脂質異常症患者血清より単離した oxHSA について検討を行った結果、タンパク質分子内のシステイン残基がジスルフィド結合を形成した可逆的な酸化を受けている可能性が示唆された。そこで、LC-MS/MS を用いて oxHSA とジスルフィド結合を形成しているチオール低分子化合物の網羅的な解析を行った結果、還元型血清アルブミン(redHSA)と比較して oxHSA では、システインおよびホモシステインが有意に増加していることが明らかとなった。さらにチオール低分子化合物により修飾を受けた酸化型血清アルブミンの機能解析を行った結果、ホモシステイン化修飾により HSA 表面の疎水性領域の増加や低分子化合物との結合能の増加が明らかとなった。また、システイン残基の酸化修飾の中でもホモシステイン化修飾によって HSA が COX-2 誘導活性を有することが確認された。以上の結果から、システイン残基のホモシステイン化修飾がタンパク質の構造変化および機能性変化に関与していることが予想された。現在、HSA のホモシステイン化修飾部位について更なる解析中である。

serum albumin, inflammation, oxidation

講演番号：3A01p14
講演日時：3 月 19 日 17:35～ A 校舎 01 会場

# ジアジド標識ホモシスチンを用いた S-ホモシステイン化タンパク質の解析

# Analysis of S-homocysteinylated protein by use of Diazide-Homocystine

柴田 貴広[1]、○神谷 孝平[1]、中島 史恵[1]、内田 浩二[1,2]([1]名大院・生命農、[2]東大院・農生化)
Takahiro SHIBATA[1], ○Kohei KAMIYA[1], Fumie NAKASHIMA[1], Koji UCHIDA[1,2] ([1]Grad. Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ., [2]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】DNA から転写・翻訳されて合成されたタンパク質は、生体内で様々な翻訳後修飾を受けることが知られている。タンパク質の翻訳後修飾は、分化や細胞死等の生命活動の維持に関与することが広く知られているだけでなく、生体の状態を反映していることが明らかとなってきた。これまでに当研究室において、脂質異常症患者血清はコントロール血清と比較して、遊離のシステイン残基が S-システイン化や S-ホモシステイン化修飾を受けた酸化型血清アルブミンを多く含むことが明らかとなっている。さらにこれらの酸化型血清アルブミンは遊離のシステイン残基だけでなく、分子内ジスルフィド結合を形成しているシステイン残基も低分子化合物によって修飾を受けている可能性が示唆されている。そこで本研究では、ホモシステインの二量体であるホモシスチンの二つのアミノ基をアジド標識したジアジド標識ホモシスチン(Diazide-Hcyst)を作製し、S-ホモシステイン化修飾を受けるタンパク質の探索を行うとともに、その修飾部位の同定を行うこととした。
【方法・結果】ホモシスチンとアジド酢酸スクシンイミドエステルを室温で 2 時間インキュベートしたのち、HPLC に供した結果、二つのピークが確認された。それぞれのピークを分取し、LC-MS に供した結果、二つのピークはホモシスチンの二つのアミノ基のうち片方がアジド標識されたアジド標識ホモシスチン(Azide-Hcyst)および､両方がアジド標識された Diazide-Hcyst であることが明らかとなった。以後の検討には、分取・精製した Diazide-Hcyst のみを使用した。作製した Diazide-Hcyst の反応性を確認するため、モデルタンパク質として血清アルブミン用いて検討を行った。Diazied-Hcyst と血清アルブミンを 37℃で 5 時間インキュベートした後、Alkyne-Biotin とクリック反応を行った。その後、ウェスタンブロッティングに供し、HRP 標識アビジンにより検出を行った結果、血清アルブミンは Diazide-Hcyst の濃度依存的に修飾されることが明らかとなった。次に、血清中の S-ホモシステイン化修飾を受けるタンパク質の探索を行った。Diazide-Hcyst と血清を 37℃で 5 時間インキュベートした後、アビジンビーズを用いてプルダウンを行った結果、複数のバンドが確認された。検出されたバンドを切り出し、ゲル内消化の後、MALDI-TOF MS に供した結果、血清アルブミンの他に IgG 重鎖やフィブロネクチンなど、計 8 種類のタンパク質を同定した。現在、プルダウンにより同定されたタンパク質について、その修飾部位の解析等を行っている。

oxidation, protein modification, homocystein

講演番号：3A01p15
講演日時：3 月 19 日 17:50～ A 校舎 01 会場

# アダクトーム解析法を用いた高脂血症バイオマーカー候補の探索

# Adductome-based identification of biomarkers for hyperlipidemia.

○柴田 貴広[1,2]、清水 和真[1]、平野 啓太[1]、菊地 良介[3]、松下 正[3]、内田 浩二[1,4]（[1]名大院・生命農、[2]JST さきがけ、[3]名大・医・附属病院、[4]東大院・農生科）
○Takahiro SHIBATA[1,2], Kazuma SHIMIZU[1], Keita HIRANO[1], RYOSUKE KIKUCHI[3], TADASHI MATSUSHITA[3], Koji UCHIDA[1,4] ([1]Grad. Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ., [2]JST PRESTO, [3]Nagoya Univ. Hospital, [4]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo)

[背景・目的]
反応性の高い短鎖アルデヒド類は、大気汚染物質として環境中に広く存在するだけでなく、食品における脂質の酸化的劣化産物として知られている。また、酸化ストレス条件下においては、細胞膜を構成するリノール酸やアラキドン酸などの多価不飽和脂肪酸の酸化により、生体内においても生成される。このように、我々は外因的あるいは内因的に、アルデヒド類にさらされているものといえる。こうした脂質過酸化反応により生じるアルデヒド類は、高い親電子性ゆえに、タンパク質中のリジン残基やヒスチジン残基などの求核性アミノ酸残基を介して共有結合し、様々な修飾付加体が形成されることが知られている。こうして形成される修飾付加体は、酸化ストレスなどのマーカーとなるだけでなく、パターン認識受容体などによって認識されるダメージ関連分子パターンとして、炎症応答などに関与する可能性が示唆されている。そこで本研究では、タンパク質アダクトーム解析法を用いて、酸化低密度リポタンパク質 (LDL) 中に生成される修飾付加体の同定を行うとともに、in vivo における修飾付加体の生成について検討を行った。
[方法・結果]
ヒト血液より調製した LDL を 5 μM $Cu^{2+}$存在下で 24 時間インキュベーションすることにより、酸化 LDL を得た。得られた酸化 LDL および未酸化の LDL を水素化ホウ素ナトリウムで還元後、塩酸雰囲気下 110℃で 24 時間インキュベーションし、加水分解を行った。加水分解サンプルを LC-ESI-MS/MS に供し、LDL 中に生成する修飾付加体の網羅的解析を行った。この時、リジン修飾体およびヒスチジン修飾体のそれぞれに特異的なフラグメントパターンを利用することにより、それぞれを選択的に検出した。その結果、コントロールの LDL と比較し、酸化 LDL において顕著に生成するリジン修飾付加体として $N^{\varepsilon}$-(8-carboxyoctanyl)lysine (COL)を同定した。またこのリジン修飾付加体は、高脂血症モデルマウスである ApoE 欠損マウスやヒト高脂血症患者血清中に有意に生成することが明らかとなった。以上の結果から、COL 付加体が高脂血症におけるマーカーとなりうる可能性が示唆された。

protein modification, mass spectrometry, biomarker

講演番号：3A01p16
講演日時：3 月 19 日 18:05～ A 校舎 01 会場

# 骨分化誘導タンパク質 NELL1 の Robo ファミリー受容体への結合能の解析

# Robo family receptors-binding activity of osteoinductive protein NELL1

○山本 菜央佳[1]、新美 友章[2] ([1]名大・農、[2]名大院・生命農)
○Naoka YAMAMOTO[1], Tomoaki NIIMI[2] ([1]Sch. Agr. Sci., [2]Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ.)

【目的】頭蓋骨縫合早期癒合症 (Craniosynostosis) 患者の頭部縫合線で過剰発現していることから発見された *NELL1* 遺伝子は、ラミニン G ドメイン、コイルドコイル領域、4 つの von Willebrand factor type C (vWC) ドメイン、および 6 つの epidermal growth factor (EGF) 様ドメインからなる分子量約 140 k の分泌タンパク質をコードしている。NELL1 タンパク質は脳や正常な頭蓋冠組織に発現しており、間葉系細胞に対して特異的に骨分化を誘導することから、骨再生医療への応用が期待されている。

先行研究において、NELL1 がインテグリン β1 受容体に結合し、Wnt/β-カテニンシグナル経路を活性化することによって骨分化を促進することが明らかにされているが、インテグリン β1 受容体への結合だけでは特異的な骨分化誘導を説明できず、他の受容体への結合が骨分化誘導に関与する可能性が示唆されている。最近、NELL ファミリーである NELL2 が Robo3 受容体と結合して脳神経の軸索誘導を行うことが報告されたことに注目し、本研究では NELL1 と Robo ファミリーとの結合活性を解析することによって NELL1 の新奇受容体を明らかにすることを目指した。

【方法と結果】マウス頭蓋冠由来前駆骨芽細胞株 MC3T3-E1 における *Robo* ファミリー遺伝子の発現の有無を RT-PCR 法によって調べたところ、Robo1, 2, 3 の発現が検出されたが、Robo4 の発現は見られなかった。また、新生児期および成体マウスから頭蓋冠を採取し、同様に *Robo* ファミリー遺伝子の発現を調べたところ、新生児期のマウス頭蓋冠において、Robo3 の発現が見られた。次に、NELL1 タンパク質の Robo ファミリー受容体への結合活性を調べるために、HA タグを融合した Robo ファミリー受容体と FLAG タグを融合した NELL1 タンパク質の発現ベクターを作製してヒト 293-F 細胞に遺伝子導入し、培養上清の混合液に対して共免疫沈降を行った。その結果、NELL1 は NELL2 と同様に Robo3 に結合した。以上のことから、新生時期の頭蓋冠において NELL1 は Robo3 受容体に結合することが推測された。NELL1 タンパク質には 5 番目の EGF 様ドメインを欠失したスプライシング産物が存在し、このスプライシング産物は Robo3 に結合できないことから、NELL1 と Robo3 の結合を負に制御している可能性が考えられた。現在、NELL1 と Robo3 受容体の結合が骨分化誘導に関与するかどうかを調べるため、Robo3 の下流のシグナル伝達経路について調べている。

NELL1, Robo family, Osteoblast

講演番号：3A02a01
講演日時：3 月 19 日 09:20～ A 校舎 02 会場

# 前駆脂肪細胞分化前におこる DNA 複製の意義

# The role of DNA replication during mitotic clonal expansion

大河内 七海[1]、竹林 慎一郎[2]、緒方 正人[2]、緒方 進[1]、○奥村 克純[1] ([1]三重大院生資、[2]三重大院医)
Nanami Okochi[1], Shin-ichiro Takebayashi[2], Masato Ogata[2], Shin Ogata[1], ○ Katsuzumi Okumura[1] ([1]Grad. Sch. Bioresources Mie Univ., [2]Grad. Sch. Med. Mie Univ)

【目的】

脂肪前駆細胞は細胞同士の接触によって増殖が停止した後，分化誘導を行うと再び約 2 回の細胞分裂を行う．この過程をクローン増殖（mitotic clonal expansion：MCE）と呼ぶ．MCE は脂肪細胞の分化に必要不可欠であると考えられているが，そのメカニズムについては未だ理解が乏しい．我々は，前駆脂肪細胞には「増殖のための複製」と「分化のための情報の書き換えが行われる複製」の 2 種類の DNA 複製が存在するという仮説を立てている．本研究は MCE 中の DNA 複製回数が脂肪細胞の分化に及ぼす影響を明らかにすることを目的とし，検討を行った．

【方法・結果】

MCE 中の 1 回目，2 回目の DNA 複製をそれぞれヌクレオシド類似体で標識し，分化誘導後 8 日目に免疫蛍光染色法により視覚的に検出した．次に標識した細胞の脂肪滴を染色することで，分化した細胞の割合と脂肪滴の大きさを測定した．その結果，分化した細胞の割合と 1 細胞あたりの脂肪滴の総面積は，2 回複製を行った細胞で最も高い値を示した．これらは MCE 中の DNA 複製回数が脂肪細胞への分化開始とその後の分化を制御することを示唆している．

前駆脂肪細胞はホルモン刺激により MCE を経て，脂肪細胞分化に関わる遺伝子およびタンパク質の発現を行うことで脂肪細胞へと分化する．特にインスリンシグナル伝達は脂肪細胞分化の key factor であることが知られている．今回，DNA 複製標識と免疫蛍光染色を行い，MCE 中の DNA 複製に伴ったインスリン受容体タンパク質および脂肪細胞分化に関わるタンパク質（Pparγ，C/ebpα）の発現解析を行った．インスリン受容体は顕著な差がなかった一方で，Pparγ，C/ebpα に関しては 2 回複製を行った細胞で発現が高かった．つまり，MCE 中の DNA 複製に依存して分化に関わる遺伝子およびタンパク質発現が制御されていると考えられる．

DNA 複製の際はクロマチン成分も同時に倍化し，この時にエピゲノム修飾が変化することで，遺伝子発現に影響することが知られている．脂肪細胞への分化においても，MCE 中の DNA 複製依存的に変化したエピゲノム修飾が「増殖」から「分化」へのスイッチを制御している可能性が考えられる．今後 MCE 中の DNA 複製依存的に働く，重要な因子を明らかにすることで新規の肥満予防・治療法開発につながると考えられる．

adipocyte differentiation, mitotic clonal expansion, DNA replication

発表責任者：奥村克純（katsu@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：3A02a02
講演日時：3 月 19 日 09:35～ A 校舎 02 会場

# 白色脂肪組織の部位特異的な形質の解析 ―皮下脂肪組織，内臓脂肪組織，異所性脂肪組織の性質の差異の解明―

# Depot-specific properties of white adipose tissues - the difference in the gene expression in adipose tissues -

○鎌田 奈都美[1]、金井 すみれ[2]、眞田 洋平[2]、加藤 範久[2]、島田 昌之[2]、矢中 規之[2] ([1]広島大・生物生産、[2]広島大院・生物圏)
○ Natsumi KAMADA[1], Sumire KANAI[2], Yohei SANADA[2], Norihisa KATO[2], Masayuki SHIMADA[2], Noriyuki YANAKA[2] ([1]Faculty of Applied Biological Sci., Hiroshima Univ., [2]Graduate School of Biosphere Sci., Hiroshima Univ.)

【目的】白色脂肪組織は，皮下脂肪型，内臓脂肪型，および異所性脂肪型に分類され，各脂肪組織の代謝性疾患などの病態発症への関与は大きく異なると考えられている．異所性脂肪の中でも特に心臓周囲脂肪組織は，冠動脈疾患などとの関連性が示されるなど病態発症における重要な役割が示唆されているが，心臓周囲脂肪組織の性質や形成に関する解析例は極めて少ない．さらに皮下脂肪，および内臓脂肪の形質の差異を明らかにすることは極めて重要であることから，各白色脂肪組織の特性と組織形成のメカニズムの解明を目的として詳細な比較解析を行った．

【方法・結果】遺伝性肥満 db/db マウスの鼠径部皮下脂肪組織，腸間膜脂肪組織，および精巣上体脂肪組織，さらに異所性脂肪型である心臓周囲脂肪組織より total RNA を調製し，real-time PCR 法を用いて遺伝子発現解析を行った結果，炎症性マーカーである *TNFα* やマクロファージマーカーの発現量は皮下脂肪組織において低く，一方，DNA microarray 解析の結果から心臓周囲脂肪組織において *UCP1* や *PGC-1α* などの褐色脂肪マーカーやレチノイン酸合成に関連した因子群の発現量が著しく高いことが示された．そこで，レチノイン酸応答配列(RARE)の下流にレポーター遺伝子である *lacZ* を連結した RARE-*LacZ* 遺伝子を有する遺伝性肥満マウス db/db を作出した．各脂肪組織の *lacZ* の遺伝子発現を解析した結果，心臓周囲脂肪組織において発現量が極めて高いことが明らかとなった．さらに，従来より白色脂肪組織マーカーとして捉えられている homeobox 型遺伝子 *Hoxc6*, *Hoxc8*, および *Hoxc9* などが皮下脂肪組織において高発現し，肥満時の内臓脂肪組織で発現量が低下していた．

【考察・展望】心臓周囲脂肪組織において心臓表層の心外膜マーカーの発現量が高く，またレチノイン酸作用は心臓周囲脂肪組織の上皮間葉転換に関わっている可能性が示唆された．また，皮下脂肪組織で極めて発現量が高かった Hox ファミリーは炎症性の低下など皮下脂肪型白色組織の形質に関与している可能性が考えられた．

adipose, retinoic acid, obesity

講演番号：3A02a03
講演日時：3 月 19 日 09:50～ A 校舎 02 会場

肥満白色脂肪組織で高発現する amphiregulin の単離と脂肪組織特異的過剰発現マウスの作製
Isolation of amphiregulin in obese adipose tissue and it's pathological role
○有馬 岳志[1]、楊 波[2]、久本 高央[2]、中村 美奈子[2]、眞田 洋平[2]、加藤 範久[2]、外丸 祐介[3]、島田 昌之[2]、矢中 規之[2] ([1]広島大生物生産、[2]広島大院生物圏科学、[3]広島大自然科学センター)
○Takeshi Arima[1], Bo Yang[2], Takao Kumoto[2], Minako Nakamura[2], Yohei Sanada[2], Norihisa Kato[2], Yusuke Sotomaru[3], Masayuki Shimada[2], Noriyuki Yanaka[2] ([1]Hiroshima Univ. Applied Biological Science, [2]Hiroshima Univ. Graduate School of Biosphere Science, [3]Hiroshima Univ.)

［背景・目的］
生活習慣病である肥満の発症は糖尿病や高血圧などの基盤となる病態である. 肥満形成において白色脂肪組織の大部分を構成する白色脂肪細胞の肥大化についての解析は行われてきたが, 白色脂肪細胞の数の制御の分子メカニズムは未解明な部分が多い. 一方, 肥満脂肪組織の増大は, 慢性炎症の発症などにより液性因子であるアディポサイトカインの産生, 分泌を介して糖尿病や癌などの様々な発症リスクに関与している. 本研究で見出した肥満白色脂肪組織において高発現する amphiregulin(AREG)はEGF ファミリーの一つであり, 癌細胞の増殖や血管新生, 癌細胞の浸潤などの多彩な生理作用を示す点で癌治療の分野において近年注目されている. そこで, 肥満白色脂肪組織における AREG 高発現の病態的意義の解明に着手した.
［実験方法・結果］
肥満発症に伴って発現変動する遺伝子を探索するため, 高脂肪食飼育した肥満 *db/db* マウスの精巣周囲白色脂肪組織における遺伝子発現を網羅的に解析した結果, AREG の発現量の著しい増加を見出した. 高脂肪食負荷(HFD)マウスの精巣周囲白色脂肪組織においても AREG は発現量が増加し, また AREG mRNA の発現量とマクロファージマーカー*Emr-1* やマクロファージの遊走に関わる *MCP-1* の発現量は正に相関しており, マクロファージの白色脂肪組織への浸潤量の増加が AREG の発現誘導に深く関わることが示唆された. さらに, マウス大腿骨の骨髄由来単核球から誘導した M1 および M2 様マクロファージ細胞の発現解析を行ったところ, M1 マクロファージにおいてのみ AREG の発現が見られ, 肥満白色脂肪組織における AREG mRNA の発現はマクロファージの浸潤に伴う M1 マクロファージの増加が関与する可能性が示唆された.
マウス AREG の全長 cDNA を単離し, 脂肪組織特異的 *aP2* promoter と AREG cDNA を連結させたコンストラクトを作成し, マウス受精卵に対してマイクロインジェクションを行い, 白色脂肪組織特異的に AREG を過剰発現するトランスジェニックマウス(AREGTg マウス)を作製した. この AREGTg マウスの白色脂肪組織を解析したところ, 予想に反して精巣周囲の白色脂肪組織重量が有意に減少しており, 脂肪組織切片を用いて H&E 染色したところ脂肪細胞サイズの縮小が認められ, AREG が白色脂肪細胞の肥大化を抑制する可能性を示唆した. 一方, AREGTg マウスの白色脂肪組織において,TNF-α の発現量の上昇が認められ,AREG の炎症性アディポサイトカインとしての可能性が示唆された.

amphiregulin, obesity, adipose

講演番号：3A02a04
講演日時：3 月 19 日 10:05～ A 校舎 02 会場

抑制性転写因子 BCL11B による脂肪細胞分化および脂肪蓄積制御の解析
Identification of BCL11B as a regulator of adipogenesis

○井上 順[1]、井原 悠介[1]、塚本 大介[1]、安本 啓甫[1]、橋詰 力[1]、中井 雄治[2]、清水 誠[1]、佐藤 隆一郎[1] ([1]東大院農生科・応生化、[2]弘前大・食料研)
○Jun INOUE[1], Yusuke IHARA[1], Daisuke TSUKAMOTO[1], Keisuke YASUMOTO[1], Tsutomu HASHIDUME[1], Yuji NAKAI[2], Makoto SHIMIZU[1], Ryuichiro SATO[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]IFS, Hirosaki Univ.)

【目的】BCL11BはT細胞の初期分化を制御する、Kruppel様$C_2H_2$型Znフィンガーモチーフを持つ転写因子であり、*BCL11B*ノックアウト(KO)マウスは生後24時間以内に死亡する。*BCL11B*-KOマウスの胎仔では肩甲骨間皮下脂肪組織が萎縮することから、BCL11Bの脂肪組織形成への関与が示唆された。そこで、BCL11B欠損による脂肪組織萎縮の分子機構について解析を行った。
【方法】（１）前駆脂肪細胞3T3-L1およびマウスの胎児線維芽細胞（MEFs）を脂肪細胞分化誘導し、BCL11Bの発現をmRNAおよびタンパク質レベルで解析した。（２）3T3-L1細胞のBCL11B発現をsiRNAによりノックダウンさせ、脂肪細胞分化に及ぼす影響を検討した。同様に野生型および*BCL11B*-KOマウス由来MEFsを調製し検討した。（３）3T3-L1細胞にBCL11Bを過剰発現させ、脂肪細胞分化への影響を検討した。（４）野生型および*BCL11B*-KOマウス由来MEFsを用いてマイクロアレイ解析を行い、BCL11B下流遺伝子の同定を試みた。（５）*BCL11B*ヘテロマウスに高脂肪食を負荷し、その表現型を観察した。
【結果・考察】（１）BCL11Bは脂肪細胞分化の初期に一過的に発現上昇した。その上昇は脂肪細胞分化誘導カクテルに含まれるデキサメタゾンに起因していた。（２）3T3-L1細胞におけるBCL11Bの発現をノックダウンすると脂肪細胞への分化が抑制された。同様に*BCL11B*-KOマウス由来MEFsでは野生型と比較して脂肪細胞への分化能が低下していた。（３）BCL11Bの過剰発現により、予想に反して、脂肪細胞分化が抑制された。この結果より、BCL11Bの恒常的な発現上昇は脂肪細胞分化を抑制することが示された。（４）マイクロアレイ解析の結果、*BCL11B*-KOマウス由来MEFsではWnt/β-cateninシグナルの活性化が観察され、BCL11BがWnt/β-cateninシグナルを抑制する可能性が示された。（５）*BCL11B*ヘテロマウスは野生型と比較し、高脂肪食負荷による体重増加量および白色脂肪組織の重量が低下しており、BCL11Bがマウス生体においても脂肪の蓄積に関与することが示された。一方で脂肪組織における脂肪細胞分化マーカーの発現には変動が見られなかった。代謝ケージによる解析の結果、*BCL11B*ヘテロマウスでは酸素消費量および二酸化炭素排出量の上昇が観察され、エネルギー消費が亢進していた。以上の結果より、BCL11Bは脂肪細胞分化を正に制御する新規因子であり、マウス個体においてはエネルギー代謝に関与することが明らかになった。
Inoue, J. *et al.* (2016) *Sci. Rep.* **6**, 32750.

Adipogenesis, Wnt/β -catenin, Enaergy metabolism

発表責任者：井上順（ajinoue@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A02a05
講演日時：3 月 19 日 10:20～ A 校舎 02 会場

# 間葉系幹細胞分化のレチノイン酸制御に与える接着斑タンパク質ビネキシンの影響

# The effect of focal adhesion protein vinexin on mesenchymal stem cell differentiation regulated by retinoic acid

○高田 恭子[1]、黒田 美都[1,3]、木村 泰久[1]、植田 和光[1,2]、木岡 紀幸[1,2]（[1]京大農、[2]iCeMS、[3]日本学術振興会特別研究員 DC）
○ KYOKO TAKATA[1], MITO KURODA[1,3], YASUHISA KIMURA[1], KAZUMITSU UEDA[1,2], NORIYUKI KIOKA[1,2] ([1]Kyoto Univ., [2]iCeMS, [3]JSPS Research Fellow DC)

【背景・目的】

ビタミンAの代謝物であるレチノイン酸は､多分化能をもつ間葉系幹細胞の骨芽細胞分化を促進し、脂肪細胞分化を抑制する。これらの作用はレチノイン酸受容体とよばれる核内受容体を介している。また一方で接着斑タンパク質ビネキシン β は、このレチノイン酸受容体の一つであるレチノイン酸受容体 γ に結合してその活性を阻害し、レチノイン酸刺激に誘導される遺伝子発現を抑制することが報告されている。しかし、ビネキシンがレチノイン酸によって抑制される脂肪細胞および骨芽細胞への分化に与える影響については不明である。そこで本研究では、ビネキシンが間葉系幹細胞の分化に与える効果について検証した。

【方法・結果】

まずビネキシンのレチノイン酸受容体への結合能を、ビネキシン精製タンパク質を用いたプルダウンアッセイによって評価した。ビネキシンにはビネキシンαとビネキシンβの２種類のスプライシングバリアントがある。ビネキシンαはビネキシンβの領域に加え、N 末端側に 404 アミノ酸を含む長いバリアントであり、この二種類を実験に使用した。その結果ビネキシンαおよびβは、３種類のレチノイン酸受容体(α、β、γ)のうち、レチノイン酸受容体γをより多く共沈降させた。またビネキシンαはビネキシンβより多くのレチノイン酸受容体を共沈降させた。この結果から、ビネキシンβだけでなくαも、レチノイン酸受容体に結合してその活性を調節している可能性が示唆された。次にビネキシンが間葉系幹細胞分化のレチノイン酸制御に与える影響について調べた。間葉系幹細胞のモデル細胞としてマウス胚由来の 10T1/2 細胞を用い、レンチウイルスを用いてビネキシン発現抑制細胞を作製した。発現抑制細胞ではビネキシンα、βの発現量がいずれも 5%に抑制された。作製した細胞をインスリン、IBMX、デキサメタゾン、トログリタゾン処理するとともに、持続的にレチノイン酸(1μM)で処理をした。４日後に細胞から RNA を抽出し、骨芽細胞や脂肪細胞の分化に伴って発現が変動する遺伝子の mRNA 発現量をリアルタイム PCR によって評価した。その結果レチノイン酸処理によって、骨芽細胞で発現が上昇することが知られているアルカリホスファターゼ(ALP)の mRNA 発現量が大きく増加することが確認された。また、ビネキシンを発現抑制した細胞ではアルカリホスファターゼの mRNA 発現量はコントロール細胞に比べてより高くなることがわかった。このことから、ビネキシンはレチノイン酸によって制御される間葉系幹細胞分化の効率を制御する可能性が考えられる。

retinoic acid, vinexin, mesenchymal stem cell

講演番号：3A02a06
講演日時：3 月 19 日 10:45～ A 校舎 02 会場

ビンキュリンはアクチン細胞骨格を介して間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化を抑制する
Vinculin Inhibits Adipocyte Differentiation through Actin Cytoskeleton
○黒田 美都[1,3]、植田 和光[1,2]、木岡 紀幸[1] ([1]京大農、[2]京都大学 iCeMS、[3]日本学術振興会特別研究員 DC)
○Mito KURODA[1,3], Kazumitsu UEDA[1,2], Noriyuki KIOKA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Univ. iCeMS, [3]JSPS Research Fellow DC)

〔背景・目的〕間葉系幹細胞は脂肪細胞や骨芽細胞など様々な細胞に分化する多能性幹細胞である。動物細胞の周囲にはコラーゲンなどの細胞外基質(ECM)が存在しており、TGFβなどの液性因子に加えて、ECM の物理的な性質も幹細胞の分化運命を決定している。例えば脂肪組織のように軟らかい ECM 上では幹細胞は脂肪細胞に分化しやすくなる。さらに ECM の硬さに応じた細胞分化の調節には転写因子 YAP/TAZ(以下 TAZ)が関与している。私たちは細胞が ECM の硬さを感知して幹細胞の分化を調節する仕組みを明らかにしようとしてきた。これまでに接着斑に局在するタンパク質ビンキュリンが ECM の硬さに応答してアクチンとの親和性が高い構造へと変化すること、転写因子 TAZ の核局在を促進すること、さらにそれによって脂肪細胞への分化を抑制していることを明らかにしてきた。しかし、ビンキュリンがどのように TAZ の局在を調節しているかは不明であった。繊維状アクチンの減少は TAZ の核局在を抑制することが知られている。そこで本研究では、「ビンキュリンがアクチンを介して転写因子 TAZ の局在と脂肪細胞への分化を調節している」という仮説を立て、これを検証した。

〔方法・結果〕マウス骨髄由来間葉系幹細胞株である ST2 細胞をモデル細胞として用いた。細胞培養基板には、ビスアクリルアミドの混合率を変えることで硬さ可変なポリアクリルアミドゲルを用い、表面にはコラーゲンコートを施した。初めに、ST2 細胞においてアクチン重合状態が TAZ の局在調節に与える影響を調べるため、アクチン重合阻害剤であるサイトカラシン D で細胞を処理し、TAZ の免疫染色を行った。その結果、コントロール細胞ではサイトカラシン D 処理によって TAZ の核局在が抑制された。このことから ST2 細胞でもアクチンによって TAZ の核局在が調節されていることがわかった。一方でビンキュリン発現抑制細胞をサイトカラシン D 処理したところ、TAZ の核局在は影響を受けなかった。次に、ビンキュリンのアクチン結合能が ECM の硬さに応じた TAZ の核局在に与える影響を調べるため、アクチン結合能が低下するビンキュリン変異体を発現する細胞を用いた。野生型ビンキュリン発現細胞では軟らかい ECM 上に比べて硬い ECM 上で TAZ の核局在が増加した。一方でアクチン結合能変異体発現細胞ではいずれの ECM 上でも TAZ の核局在に差はなく、硬い ECM 上では野生型に比べて TAZ の核局在が減少していた。これらの結果は、ビンキュリンはアクチンを介して TAZ の核局在を促進し、脂肪細胞分化を抑制しているという仮説を支持するものである。

adipocyte, focal adhesion, mesenchymal stem cell

発表責任者：黒田 美都（mkuroda@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3A02a07
講演日時：3 月 19 日 11:00～ A 校舎 02 会場

細胞分化における核内アクチンの機能解析
Functional Analysis of Nuclear-actin in Cell Differentiation
○横山 吟司[1]、山本 浩志[2]、山崎 祥他[2]、十川 久美子[3]、徳永 万喜洋[3]、原田 昌彦[1,2]([1]東北大農、[2]東北大院農、[3]東工大院生命理工)
○Ginji YOKOYAMA[1], Kouji YAMAMOTO[2], Shota YAMAZAKI[2], Kumiko SOGAWA[3], Makio TOKUNAGA[3], Masahiko HARATA[1,2] ([1]Tohoku Univ., [2]Tohoku Grad. Univ., [3]Tokyo Tech. Grad. Univ.)

[背景]アクチンは細胞骨格の主要な構成因子であり、細胞の形態維持や遊走、細胞質分裂など様々な生命現象に寄与している。細胞質と比較して少量ではあるが、アクチンは細胞核内にも広く存在している。核内の単量体アクチン(G-アクチン)はクロマチンリモデリング複合体の構成因子であり、ゲノムの構造変換を介した転写制御に重要な役割を持つ。繊維化アクチン(F-アクチン)も核内で観察される。たとえば、体細胞クローンの作成過程における遺伝子発現の初期化(リプログラミング)の際に観察される核内 F-アクチンは、初期化因子 OCT4 の転写活性化に重要である。本研究室ではこれまで、核内の F-アクチンが転写共役因子であるβ-catenin を介して Wnt/β-catenin シグナルを活性化すること、また人為的な核内 F-アクチンの形成誘導により OCT4 の転写誘導が再現可能であることを明らかにした(1)。Wnt/β-catenin シグナルは遺伝子プログラミングに加えて、発生や分化にも重要な役割を持つことが知られている。これらの背景から、核内 F-アクチンが Wnt/β-catenin シグナルを介して細胞分化にも関与する可能性を考え、その解析を行った。
[結果と考察]ヒトケラチノサイトの一種である HaCaT 細胞は、$Ca^{2+}$の添加により容易に分化を誘導することが可能で、さらに分化マーカーであるケラチン 10(K10)の発現量から分化度を評価することができる。本研究室ではまず、蛍光タグを融合したアクチンを HaCaT 細胞で発現させ、分化の過程におけるアクチンの挙動を観察した。その結果、$Ca^{2+}$分化誘導により核内におけるアクチン局在量の一過的な上昇が認められた。また、核内で増加したアクチンは F-アクチンプローブで染色されたことから、分化過程の核内アクチンの少なくとも一部は F-アクチンであることを確認した。次に、核移行シグナル (NLS) を付加したアクチン(NLS-アクチン)を HaCaT 細胞で発現させ、人為的に核内アクチン量を増加させた。その結果、核内アクチン量の増加により $Ca^{2+}$の非添加条件下でも K10 の発現が上昇し、分化が誘導されることが示された。さらにレポーターアッセイの結果から、核内アクチン量の増加によって HaCaT 細胞でも Wnt/β-catenin シグナルが活性化していることを見出した。これらの結果は、核内のアクチンが Wnt/β-catenin シグナルを介して HaCaT 細胞の分化制御に関与する可能性を示している。

(1) Yamazaki, S. et al., Nuclear F-actin enhances the transcriptional activity of β-catenin by increasing its nuclear localization and binding to chromatin. Histochem Cell Biol. 145: 389-399, 2016.

nuclear-actin, differentiation, Wnt/β-catenin signaling

発表責任者：横山吟司（4580gandhi@gmail.com）

講演番号：3A02a08
講演日時：3 月 19 日 11:15～ A 校舎 02 会場

乳腺退縮に関わる転写因子の発現および機能解析
Analysis of expression and function of the transcription factor involved in mammary gland involution
○藤田 夢実、柴山 太寿、蒲野 悟史、大島 健司、松田 幹、灘野 大太 (名大農)
○Yumejichi FUJITA, Hirohisa SHIBAYAMA, Satoshi GAMANO, Kenzi OSHIMA, Tsukasa MATSUDA, Daita NADANO (Nagoya Univ.)

【目的】乳腺の退縮は、離乳に伴って起こる乳汁の蓄積によって引き起こされる。退縮初期において、乳汁を分泌する上皮細胞の一部にアポトーシスが現れ始めるが、乳腺全体としての構造は維持されている。この段階では、再び吸引刺激を与えることで泌乳期の状態へと戻ることができる。この初期段階で搾乳が再び行われない場合、アポトーシスを含む細胞死の亢進により組織全体としての再構成が次の段階に起こり、乳腺は最終的に妊娠前の状態に戻る。本研究室では、乳腺退縮のメカニズムに着目し、退縮初期のマウス乳腺において高発現する遺伝子のスクリーニングを行った結果、転写因子 Sox4 が同定された。Sox4 は初期の胚形成や臓器の発達、およびがんに関与することが報告されているが、乳腺との関係は未解明である。Sox4 の乳腺退縮における役割を明らかにすることを最終目標とし、本研究では、Sox4 のマウス乳腺での発現レベルや局在および培養細胞株を用いて機能について解析した。
【方法及び結果】泌乳中期 (10 日) および退縮初期 (離乳 2 日後) のマウス乳腺組織のメッセージレベルでの Sox4 の発現解析により、泌乳 10 日と比べ、退縮 2 日後の発現レベルが上昇した。抗マウス Sox4 抗体の作製を行い、マウス乳腺組織におけるタンパク質レベルでの Sox4 の発現を調べた。免疫ブロッティングにより、タンパク質レベルにおいても退縮 2 日後の Sox4 の発現は泌乳期より高かった。泌乳期および退縮期のマウス乳腺組織を採取し、抗 Sox4 抗体を用いて染色した結果、退縮 2 日後のマウス乳腺上皮細胞の核において Sox4 の発現が観察された。Sox4 の機能解析の第一歩として、同タンパク質の過剰発現が細胞増殖に与える影響を検討した。ヒト子宮頸がん由来の HeLa 細胞において Sox4 を過剰発現させた。その結果、Sox4 導入細胞において、アポトーシスを起こしている細胞がコントロールと比べて有意に多かった。次に Sox4 の過剰発現ベクターをマウス乳腺上皮細胞株である HC11 細胞に導入したところ、コントロールと比べて生細胞数に大きな変化は見られなかった。がんにおいて、Sox4 は細胞の増殖促進と細胞死促進の両方に関わる報告がある。今回の結果と考え合わせると、Sox4 の細胞への影響は細胞間環境に依存することが推察された。したがって、今後乳腺により近い HC11 細胞を用いて Sox4 の機能を検討していく予定である。

mammary gland, involution, transcription factor

発表責任者：灘野　大太（nadano@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3A02a09
講演日時：3 月 19 日 11:30～ A 校舎 02 会場

# DNA 傷害によるアポトーシス誘導における DRAK1 の関連性

# Involvement of DRAK1 in DNA damage-induced apoptosis

○村上 彩良[1]、大上 友菜[2]、辻 明彦[3]、湯浅 恵造[3] ([1]徳島大院先端技術、[2]徳島大工生物工、[3]徳島大院生物資源)
○Sara Murakami[1], Yuna Oue[2], Akihiko Tsuji[3], Keizo Yuasa[3] ([1]Inst. Tech. and Sci. Tokushima Univ., [2]Fac. Eng. Tokushima Univ., [3]Inst. Biosci. Bioind. Tokushima Univ.)

【目的】Death-associated protein kinase（DAPK）ファミリーは Ser/Thr キナーゼの一つであり，細胞死をはじめとする多彩な生理機能に関与している。このファミリーに属する *DAPK-related apoptosis inducing protein kinase 1*（*DRAK1*）は染色体転座切断点近傍に位置し，ヒトには存在するが，げっ歯類には存在しないユニークな遺伝子である。これまでに DRAK1 はがん抑制遺伝子 p53 によって発現誘導され，また，その過剰発現によりアポトーシスを誘導することが報告されている。しかしながら、その詳細な分子機構は未だ不明のままであり，本研究ではその解明を目的とした。【方法・結果】まず，野生型 p53 を発現するヒト骨肉腫由来 U2OS 細胞に Strep タグ DRAK1 を遺伝子導入し，免疫細胞染色によりその細胞内局在を調べた。Strep-DRAK1 wild type は主に核に局在したのに対して，C 末端に存在する塩基性アミノ酸残基に富んだ領域（$^{392}$Lys-Ala-Ile-Ser-Lys-Arg-Phe-Lys）の Lys および Arg を Ala に置換した DRAK1 K396A/R397A 変異体は細胞質に局在した。また，同領域中にある PKC の推定リン酸化部位である Ser$^{395}$ を Asp に置換した擬似リン酸化変異体 DRAK1 S395D も細胞質に局在し, PKC 活性剤である PMA や OAG 刺激によって DRAK1 wild type は核から細胞質へ移行することが明らかとなった。これらの結果より，DRAK1 は細胞外刺激に応答して細胞内局在制御を受け，通常核内において機能することが推測された。これまでに DRAK1 は p53 によって発現誘導されること，また，アポトーシス誘導に関わることから，次に，抗がん剤として広く用いられているシスプラチンを用いて，DNA 傷害性アポトーシス誘導における DRAK1 の関連性を調べた。U2OS 細胞をシスプラチンで処理すると，濃度依存的に p53 タンパク質の発現が上昇し，さらに p53 の DNA 結合活性に関係する Ser$^{392}$ のリン酸化の増加も認められた。また，同様に DRAK1 の発現もシスプラチン濃度依存的に上昇した。これに対して，DRAK1 ノックダウン細胞では，p53 タンパク質の発現量はコントロール細胞と同レベルであったが，Ser$^{392}$ のリン酸化は有意に抑制されることが明らかとなった。これらの結果より，DRAK1 は DNA 傷害性アポトーシス誘導において，p53 に発現誘導を受けるとともに，その正の調節因子として機能することが考えられた。現在，更なる詳細な解析を行っており，併せて報告したい。

DRAK1, p53, apoptosis

発表責任者：湯浅恵造（kyuasa@tokushima-u.ac.jp）

講演番号：3A02a10
講演日時：3 月 19 日 11:45～ A 校舎 02 会場

結合モチーフに基づいたカルシウム結合タンパク質 ALG-2 の新規相互作用因子探索と同定
Search and identification of new interacting-proteins of the calcium-binding protein ALG-2 based on the binding motif

松尾 里奈、張 維、寺西 直樹、高原 照直、柴田 秀樹、○牧 正敏（名大院生命農・応分生）
Rina MATSUO, Wei ZHANG, Naoki TERANISHI, Terunao TAKAHARA, Hideki SHIBATA, ○Masatoshi MAKI (Nagoya Univ, Grad Sch Bioagric Sci)

[目的]　ALG-2（ヒト遺伝子記号　*PDCD6*）は、アポトーシス関連因子として発見されたタンパク質であり、カルシウム依存的に様々なタンパク質と相互作用することにより、細胞死、シグナル伝達、小胞輸送、細胞膜修復などに関与することが知られ、がん予後の診断マーカーとしても注目されている（参考文献１）。多くの ALG-2 相互作用タンパク質は、(i)酵母 Two-Hybrid 法、(ii)共免疫沈降あるいはプルダウン産物の質量分析、(iii)既知相互作用タンパク質との配列類似性から探索され同定されて来た。前二者の方法は標的タンパク質の存在量に大きく依存し、重要な希少タンパク質を見逃している可能性がある。我々は，これまでに Pro に富む ALG-2 結合モチーフを明らかにして来たが、本研究は，X 線結晶構造解析および変異体結合解析の結果から新たに定義した 2 型モチーフ（参考文献 2）に基づいて、新規相互作用タンパク質を探索し、新たに ALG-2 とカルシウム依存的に結合するタンパク質の同定を目的とした。
[方法および結果]　ヒトのタンパク質データベースを検索し、2 型結合モチーフをもつ配列を抽出した。このうち、任意に設定したスコアの高い十数種のタンパク質を選び、結合モチーフを含む Pro に富む領域（Pro-rich region、PRR）あるいは全長の GFP 融合タンパク質の発現プラスミドを作製した。HEK293T 細胞に発現プラスミド DNA をトランスフェクションし、細胞溶解液を用いて抗 GFP 抗体による発現タンパク質の免疫沈降を行った。そして、免疫沈降産物の SDS-PAGE 分離後、共免疫沈降産物中に ALG-2 が存在するかどうかを調べるため抗 ALG-2 抗体を用いたウェスタンブロット解析（WB）、ならびに、GFP 融合タンパク質が ALG-2 と直接結合することを検討するため標識 ALG-2 を用いたファーウェスタン解析（FW）を行った。WB、FW ともにシグナルが強かった 1 回膜貫通タンパク質 SARAF(別名 TMEM66)を選び、全長や ALG-2 結合部位(ABS)の変異体（ΔABS）発現ベクターを作製し、さらに詳細な相互作用解析を行った。ΔABS 変異体では結合が消失した。内在性タンパク質同士でのカルシウム依存的相互作用を検証するため、SARAF 細胞質ドメインの GST 融合タンパク質を抗原としてウサギに免疫し、抗血清より抗 SARAF 抗体をアフィニティ精製した。そして細胞溶解液の抗 SARAF 抗体を用いた免疫沈降産物中にはカルシウムイオン存在条件下で ALG-2 のシグナルが WB で検出されたが EGTA（カルシウムキレート剤）存在条件下では検出されなかった。同様に、抗 ALG-2 抗体による共免疫沈降実験で SARAF がカルシウム依存的に検出された。
[考察]　SARAF は、発表論文や公開されている網羅的な interactome データベースには ALG-2 との相互作用が報告されていない、全く新規の相互作用因子であり、本探索方法の有益性が証明された。PRR に２型結合モチーフが含まれていても ALG-2 との結合が微弱あるいは検出されないタンパク質がいくつか存在したが、PRR の天然変性予測結果を考慮すると、結合モチーフの前後の構造的柔軟性が重要と考えられる。SARAF は小胞体膜に存在して Store-Operated Calcium Entry (SOCE)の負の制御因子として報告されたが、SARAF と ALG-2 の相互作用の生理的意義については今後の検討課題である。
(参考文献)
1. Maki et al. (2016) Int J Mol Sci 17,1401
2. Takahashi et al. (2015) Int J Mol Sci 16, 3677

calcium, protein-protein interaction, endoplasmic reticulum

発表責任者：牧　正敏（mmaki@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3A02p01
講演日時：3 月 19 日 14:00～ A 校舎 02 会場

# ヒト細胞株において cyclin A-CDK の活性亢進が M 期進行へ及ぼす影響

# Effect of hyper-activated cyclin A-CDK on M phase progression in human cell lines

○赤池 康範、吉川 博文、千葉櫻 拓（東農大院バイオ）
○Yasunori AKAIKE, Hirofumi YOSHIKAWA, Taku CHIBAZAKURA (Tokyo Univ. Agric.)

細胞周期進行の中心制御因子である cyclin-cyclin 依存性キナーゼ（CDK）複合体の活性制御異常は、細胞の増殖・分化制御の破綻を誘導する要因となることから、がん・発生異常・老化などの疾患に深くかかわるものとして極めて重要である。これまでの研究より、分解抵抗性 cyclin A（CycAΔ80）を CDK 阻害因子（CKI）p21, p27, p107 の三重欠損マウス由来繊維芽細胞にて発現させることによる CycA-CDK の構成的な活性亢進は、中心体過剰複製および染色体分配・細胞分裂の迂回を介して、染色体倍数化を誘導することが示されているが、ヒト細胞において CycA-CDK の活性亢進が及ぼす影響は不明であった。

そこでヒト細胞における CycAΔ80 発現の影響を解析するため、ヒトがん細胞株（MDAH041, U2OS, Saos2, HT1080）、トランスフォーム株（HEK293）、及び正常細胞株（WI-38）で検証したところ、MDAH041 と HEK293 において、染色体倍数化ではなく M 期前中期での停滞を引き起こし、特に HEK293 では強い M 期停滞を引き起こした。これは CycAΔ80 に付随する CDK 活性に依存しており、CycA-CDK の活性亢進の影響がヒト細胞とマウス細胞で異なることが示唆された。次に、CycAΔ80 により M 期停滞が引き起こされる HEK293, MDAH041 と 引き起こされない他の細胞株(U2OS, Saos2, HT1080, WI-38)で CKI（p21, p27, p107）の発現レベルを比較したところ、前者で p21 と p27 の発現量がともに減少していたため、両 CKI の発現低下が M 期停滞に関与することが示唆された。

さらに、p21, p27 が発現しておらず、CycAΔ80 による M 期停滞が強く引き起こされる HEK293 において以下の解析を行った。CKI 三重欠損マウス細胞に類似した条件下で CycAΔ80 の影響を検証するため、RNAi による p107 のノックダウンとともに CycAΔ80 を発現させたところ、染色体倍数化は引き起こされず、依然 M 期停滞が引き起こされた。このことから、マウス細胞とヒト細胞で CycA-CDK の活性亢進が及ぼす影響の違いは p107 に依存しないことが示唆される。そこで、ヒト細胞における M 期停滞誘導機構として、M 期進行に必須である CycB1-CDK1 複合体の活性化が、安定化された CycAΔ80 に CDK1 が奪われることにより抑制される可能性を考え、それを検証するため CycAΔ80 とともに CDK1 を共発現させたところ、CDK1 の発現量依存的に M 期停滞が解除された。従って、ヒト細胞では M 期進行において CycA, CycB1, CDK1 の量的バランスが厳密なチェックを受けていることが示唆された。

cyclin A, CDK inhibiters, M-phase progression

講演番号：3A02p02
講演日時：3 月 19 日 14:15～ A 校舎 02 会場

新規膵臓がん幹細胞制御分子の同定
Identification of novel target for pancreatic cancer stem cell
○竹内 智枝理、高井 美佳、廣井 舜、熊添 基文、立花 宏文（九大院農院・生機科）
○ Chieri TAKEUCHI, Mika TAKAI, Shun HIROI, Motohumi KUMAZOE, Hirohumi TACHIBANA (Kyushu Univ.)

【目的】膵臓がんの 5 年生存率は 5%程度と非常に低く、有効な治療戦略の確立が急務である。近年、その原因としてがん幹細胞と呼ばれる、抗がん剤に強い耐性を有する細胞集団が注目されている。がん幹細胞集団の維持に CD44 が重要であることは知られているが、CD44 を阻害する有効な手法は確立されていない。さらに、既知のがん幹細胞機能維持分子は正常細胞においても重要な機能を有するため、安全性が高い薬剤標的の探索が強く望まれている。そこで本研究では、膵臓がん幹細胞の機能維持に関与する新たな分子の同定を目的とした。

【方法および結果】我々はこれまでに、cGMP が膵臓がん幹細胞性の指標の一つであるコロニー形成能を阻害することを見出している。そこで cGMP ががん幹細胞に対する阻害因子ではないかと予想し、cGMP 産生誘導によるがん幹細胞性への影響を、患者由来初代膵臓がん細胞を用いて評価した。その結果、CD44 及びがん幹細胞性の指標であるβ-catenin や Oct4 の発現低下、スフェロイド形成能の阻害が確認された。また、ヒト膵臓がん移植マウスモデルにおいて、cGMP 産生誘導剤の投与により腫瘍形成能および肝転移が顕著に抑制された。そこで、マイクロアレイを用いて cGMP が制御する因子の探索を行ったところ、がん抑制遺伝子として知られている Forkhead box O3 (FOXO3) を cGMP が阻害することによりがん幹細胞機能を抑制することが示唆された。RNA 干渉法を用いた FOXO3 のノックダウンにより、CD44 の発現低下、腫瘍形成能および肝転移の阻害が認められた。さらに、膵臓がん患者腫瘍組織中の CD44 陽性細胞において FOXO3 が高発現していること、また、Gene Expression Omnibus に基づく解析から、FOXO3 は膵臓がん患者の予後不良に関与していることが明らかになった[1)]。
以上の結果より、がん抑制遺伝子 FOXO3 が膵臓がん幹細胞性の維持に重要な分子であることを明らかにした。FOXO3 を全身でノックアウトしたマウスは大きな障害を発現しないこと、また、cGMP 産生誘導剤は既に臨床において幅広く用いられていることから、FOXO3 の阻害あるいは cGMP の産生誘導は膵臓がんに対する新たな治療戦略となり得ると考えられる。

1) Oncogene, doi:10.1038/onc.2016.426.

cancer stem cell, pancreatic cancer, cGMP

発表責任者：立花宏文（tatibana@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3A02p03
講演日時：3 月 19 日 14:30～ A 校舎 02 会場

抗菌ペプチドによって誘導される大腸癌細胞由来エクソソームの解析
Analysis of exosome　secreted from colon cancer cells after treatment with antimicrobial peptide
○林 美和、黒田 健吾、伊原 航平、磯貝 恵美子（東北大農）
○Miwa HAYASHI, Kengo KURODA, Kohei IHARA, Emiko ISOGAI (Tohoku Univ.)

**【目的】抗菌ペプチドは生物の自然免疫の一端を担う多機能性因子である。我々は抗菌ペプチドの抗がん作用に注目し、**ヒト由来の抗菌ペプチドである LL-37 およびその改変ペプチドである FF/CAP18 がヒト大腸癌細胞 HCT116 に対し、in vitro および in vivo において増殖抑制効果を示すことを明らかにしてきた。本研究では、抗菌ペプチドが HCT116 の細胞間コミュニケーションにもたらす影響を明らかにするため、HCT116 が分泌するエクソソームの解析を行った。

【方法】HCT116 を FF/CAP18 で処理し、限外ろ過および miRCURY Exosome Isolation Kit-Cells,Urine and CSF（Exiqon） を使用して細胞培養液からエクソソームを回収した。回収できた事を確認するため、ウェスタンブロットおよび透過型電子顕微鏡（TEM）観察によりエクソソームの検出を行った。さらに、FF/CAP18 処理による HCT116 のエクソソーム分泌量の増減を調べ、WST-8 assay (Cell Counting Kit-8) によって FF/CAP18 処理を行った HCT116 由来エクソソームの細胞増殖への影響を調べた。

【結果】FF/CAP18 処理および対照の HCT116 において、エクソソームに発現することが報告されている CD63、CD81、TSG101 が検出された。TEM 観察では膜構造を持つ 40~100nm の粒子を観察できた。FF/CAP18 処理によって HCT116 はアポトーシスを起こし、増殖が抑制されるが、生細胞あたりのエクソソームの量は未処理群に比べて FF/CAP18 処理群では増加していた。このことから、FF/CAP18 処理によって HCT116 のエクソソーム分泌量が増加することが示唆された。WST-8 assay では、FF/CAP18 処理群エクソソームと HCT116 を共培養することで HCT116 の有意な増殖抑制を認めた（$p<0.01$）。一方、未処理群エクソソームとの共培養では HCT116 の増殖抑制を認められなかった。このことから、抗菌ペプチド処理と未処理ではエクソソーム内の制御が異なると考えられる。

【考察】以上のことから、抗菌ペプチド処理と未処理では HCT116 内でのエクソソームの制御が異なることが明らかになった。FF/CAP18 処理によって HCT116 はアポトーシスを起こすが同時に細胞間における情報交換を加速させるツールとしてエクソソームを積極的に分泌する。さらに HCT116 の増殖を抑制する因が他の細胞へ運搬されることで、結果として抗がん作用を示す一連のメカニズムの存在が示唆された。今後、エクソソーム内に存在する miRNA を網羅的に発現解析し、HCT116 を増殖抑制へと導く miRNA を同定したいと考えている。加えて、FF/CAP18 処理により発現量に増減のあった HCT116 の miRNA との相関性も検証したい。

exosome, cancer, amtimicrobial peptide

発表責任者：林美和（miwa.hayashi.s7@dc.tohoku.ac.jp）

講演番号：3A02p04
講演日時：3 月 19 日 14:45～ A 校舎 02 会場

Pin1 による FoxO3 を介した P-glycoprotein の発現制御機構
Prolyl isomerase Pin1 regulates doxorubicin-inducible P-glycoprotein level by reducing Foxo3 stability
○清水 泰希、坂場 義正、川邊 庸介、内田 隆史（東北大農）
○Taiki SHIMIZU, Yoshimasa BAMBA, Yosuke KAWABE, Takafumi UCHIDA (Tohoku Univ.)

【背景】
癌治療の問題の一つに薬剤耐性がある。薬剤耐性の原因として重要な分子は ATP 結合カセット輸送体(ABC 蛋白質)であり、中でも ABCB1(MDR1 または P-gp と称される)は最も有名である。抗がん剤に暴露された癌細胞は p53 や FoxO3 などの転写因子によって P-gp の発現を誘導し、薬剤の細胞外排出を積極的に行う。P-gp の最大の特徴はその基質特異性の低さにあり、構造的／作用機構の異なる多くの抗癌剤を細胞外に排出することである。従って Pgp の発現制御は抗がん剤治療において非常に重要な課題である。The peptidyl prolyl *cis/trans* isomerase Pin1 はリン酸化された Ser/Thr に続くプロリンのペプチド結合を特異的に異性化する酵素であり、様々な蛋白質と相互作用し、シグナル伝達を制御している。これまでに我々は、Pin1KO マウスの胎児線維芽細胞(MEF)では抗がん剤である Doxorubicin によって P-gp の発現が有意に増加していること、また P-gp の発現が p53 と無関係な経路で制御していることを解明した。本研究では Pin1 による P-gp の発現制御機構を明らかにし、癌細胞の多剤耐性問題解決への新たな糸口を見つけることを目指す。
【方法・結果】
初めに各癌細胞における Pin1 と P-gp の発現量の相関を Western blot により解析したところ、Pin1 の発現量が多いほど P-gp の発現量が低くなっている傾向が確認できた。次に P-gp の転写を制御している FoxO3 の活性に着目し、MEF および HEK293T 細胞を用いて FoxO3 のレポーターアッセイを行った。すると Pin1 によって FoxO3 の活性が有意に低下していることが明らかとなった。FoxO3 と Pin1 の結合を確認するため、HEK293T 細胞に FoxO3 を発現させ、GST-Pin1 を用いて pull down を行ったところ結合が確認できた。また、乳がん細胞の一つ MCF7 を用いて IP を行ったところ、FoxO3 と Pin1 の結合が確認できた。最後に Pin1 が FoxO3 の活性をどのように制御しているのかを調べるため、FoxO3 の発現量を比較した。すると Pin1 によって FoxO3 の発現が低下していることが HEK293T 細胞および癌細胞で確認できた。
【考察】
今回の研究から、癌細胞においても Pin1 と P-gp の相関が確認され、さらに Pgp の転写因子の一つである FoxO3 の活性を負に制御していることが明らかとなった。このことから、Pin1 が FoxO3 を介して P-gp の発現を負に制御していることが示唆された。

Pin1, P-gp, FoxO3

講演番号：3A02p05
講演日時：3 月 19 日 15:00～ A 校舎 02 会場

# 分解耐性型細胞膜透過性レチノイン酸受容体（RAR）α 発現系の開発

# Development of the expression system of proteolysis-resistant and cell-permeable Retinoic Acid Receptor (RAR) α

○佐々木 拓哉、舛廣 善和、司馬 肇（日本大学　生物資源　応用生物）
○Takuya SASAKI, Yoshikazu MASUHIRO, Hajime SHIBA (Dept. of Applied Biological Sciences, Coll. Bioresources, Nihon Univ.)

細胞膜透過性タンパク質は多くの細胞に導入可能であることから、遺伝性疾患に対するタンパク質療法への応用が期待されている。過去に発表者らは急性前骨髄球性白血病（APL；acute promyelocytic leukemia）治療に応用可能なタンパク質療法の開発を目的として、細胞膜透過性 RARα (retinoic acid receptor) タンパク質を作製した。しかし、このタンパク質を用いて APL 細胞から成熟顆粒球への分化誘導を試みたところ、高い誘導効率は得られなかった。原因として、細胞内に導入したタンパク質が早期に分解されることが考えられた。一方、浙江大学の He 教授らにより、RARαの安定化が APL の治療の改善に有望であることが報告された。そこで、本研究では、発表者らが発見したタンパク質安定化モチーフ Stabilon を RARαに付与し、細胞内で RARαタンパク質を安定化させ、成熟顆粒球への効率的な分化誘導法の確立を目指す。はじめに、HeLa 細胞に Stabilon 融合 RARαを発現プラスミドにより強制発現させ、タンパク質発現を解析したところ、非融合体より約 8 倍発現量が向上していた。さらにタンパク質翻訳阻害剤を用いてタンパク質の半減期を調べた結果、Stabilon を融合することにより RARαタンパク質の分解が遅延することが示された。次に、従来の細胞膜透過性 RARαに Stabilon を付与した分解耐性型細胞膜透過性 RARα（大腸菌による組換え体）の作製を試みた。同タンパク質を大腸菌 BL21(DE3)株を用いて 25℃で発現させたところ、可溶画分に発現した。Ni レジンにより精製した同タンパク質は Gel shift assay により、DNA 結合能を有することが示された。同タンパク質を APL 細胞内に導入し、形態学的変化を指標に分化誘導作用について評価した結果、生理学的濃度のレチノイン酸条件下において成熟顆粒球への分化誘導が確認された。以上の結果から、Stabilon は RARαの生理的活性に影響を及ぼさず、タンパク質の安定化を向上することが示唆された。

RARα, APL, protein stability

講演番号：3A02p06
講演日時：3 月 19 日 15:25～ A 校舎 02 会場

# ES 細胞の神経分化における転写因子 CIBZ の機能解析
# Functional analysis of CIBZ during neural differentiation of mouse ES cells

○西尾 美紀、松田 永照（奈良先端大バイオ）
○Miki NISHIO, Eisyo MATSUDA (NAIST)

［目的］

胚性幹(embryonic stem：ES)細胞は、自己複製能及び様々な細胞に分化できる分化多能性を有する細胞である。発生段階や組織特異的な様々な転写因子が、ES 細胞の各組織への分化に重要な役割を果たしていることが知られている。しかし、分化の詳細な制御メカニズムにおいて、既知の転写因子だけでは不明点が多く残されているため、新規の転写因子の同定及びその詳細な解析が期待されている。我々の研究室で同定されたジンクフィンガードメインを有する転写因子 CIBZ は、転写活性化及び抑制化ドメインを持つ。先行研究により、ES 細胞を用いて、胚様体を形成させることによる三胚葉への分化誘導を行った際、CIBZ タンパク質が分化誘導に伴い、顕著に低下することが確認された。野生型（WT）の ES 細胞と比べて、CIBZ を欠損させた（CIBZ-/-）ES 細胞では、中胚葉系の細胞である心筋細胞への分化が促進された。詳細な解析により、CIBZ が心血管細胞系譜のマスター遺伝子である Mesp1 を介して、ES 細胞の心筋への分化を抑制することが明らかにされた。CIBZ が ES 細胞の外胚葉の細胞系列への分化にも影響を与える可能性が考えられる。本研究では、CIBZ が ES 細胞の外胚葉系の細胞である神経への分化に関与するかどうかを明らかにすることを目的とした。

［方法］

神経分化誘導によく用いられる N2B27 培地に基づく RHB-A という培地を用いて WT ES 細胞の神経分化を効率的に誘導することができた。WT の ES 細胞と CIBZ-/- ES 細胞の神経分化誘導を行い、経時的に（0、2、4、6、8 日）顕微鏡による形態観察及び細胞を回収することで、詳細な解析を行った。CIBZ の欠損が ES 細胞の神経分化に与える影響を神経分化マーカー遺伝子の発現（ mRNA 及びタンパク質）を qRT-PCR、ウェスタンブロッティング法及び免疫染色による解析を行った。

［結果］

ES 細胞の神経への分化誘導に伴い CIBZ の発現が変化することが分かった。WT ES 細胞と CIBZ-/- ES 細胞の神経への分化において、神経分化誘導過程の形態に、差が生じていることが確認できた。この表現型の違いは、神経分化のマーカー遺伝子の発現変化と相関していることが分かった。以上の結果から、CIBZ の発現が ES 細胞の神経分化に影響を与えることが考えられる。

ES cell, differentiation, zinc finger protein

講演番号：3A02p07
講演日時：3 月 19 日 15:40～ A 校舎 02 会場

*C. elegans* の ASJ ニューロンに発現する SRH-11 のリガンド応答
Ligand response of SRH-11 expressed in *C. elegans* ASJ neurons
○高須 浩[1]、金川 陽祐[1]、西村 浩二[1]、河野 強[2]、尾添 嘉久[1] ([1]島根大生資、[2]鳥取大農)
○Hiroshi TAKASU[1], Yosuke KINKAWA[1], Koji NISHIMURA[1], Tsuyoshi KAWANO[2], Yoshihisa OZOE[1] ([1]Shimane Univ., [2]Tottori Univ.)

【目的】土壌自活線虫である *Caenorhabditis elegans* は、生育環境が悪化すると休眠し、環境が改善すると休眠が打破される。休眠打破には頭部感覚ニューロン ASJ が関与すると推察されている。また最近、休眠打破物質の一つとしてウラシルが同定された。そこで我々は、ASJ ニューロンに特異的に発現している SRH-11 が、ウラシルをアゴニストとする G タンパク質共役型受容体 (GPCR)ではないかと考え、本研究では SRH-11 のウラシルに対する応答を調べた。
【方法および結果】N-末端に FLAG タグ付加した SRH-11 を HEK-293T 細胞に安定発現させ、抗 FLAG 抗体を使って免疫染色したところ、SRH-11 の膜局在が認められた。この細胞から膜画分を調製して[$^3$H]ウラシルと反応させたところ、[$^3$H]ウラシルが膜画分に特異的に結合した（$B_{max}$ = 890 fmol/mg protein, $K_d$ = 100 nM）ことから、ウラシルが SRH-11 のリガンドであることが示唆された。

続いて、GPCR の代表的なセカンドメッセンジャーである cAMP、$Ca^{2+}$、および cGMP のウラシル投与時の SRH-11 発現細胞内の変動を調べた。cAMP 測定では cAMP 結合部位を導入改変したホタルルシフェラーゼ遺伝子を、$Ca^{2+}$測定ではエクオリン遺伝子を細胞に一過性発現させて、レポーターによる発光を測定することによりそれぞれのシグナルの検出を試みた。その結果、cAMP、$Ca^{2+}$のどちらの変動も認められなかった。cGMP は、アセチルコリンエステラーゼ cGMP コンジュゲートを使用した ELISA により定量した。その結果、50 μM ウラシルを投与したとき、cGMP レベルの上昇（約 5 fmol/cells in 60 mm dish）が認められた。

SRH-11 の活性化による cGMP シグナルの発生が示唆されたので、つぎに FRET（fluorescence resonance energy transfer）を用いてその確認を行った。cGMP 特異的バイオセンサーである Cygnus を SRH-11 発現細胞に一過性発現させて、ウラシル投与直後からの細胞内 cGMP レベルの経時変化を調べた。その結果、ウラシル投与直後から蛍光強度の低下が起こり、cGMP シグナルが生成することが示された。

以上の結果から、SRH-11 はウラシル受容体であり、HEK-293T 細胞に発現させた SRH-11 がウラシルで活性化すると細胞内に cGMP シグナルが生じることが明らかになった。今後、*C. elegans* ASJ ニューロンにおける cGMP シグナルと休眠打破との関係を調べる必要がある。

*C. elegans*, uracil, cGMP

講演番号：3A02p08
講演日時：3 月 19 日 15:55～ A 校舎 02 会場

初代培養グリア細胞における 2ccPA の効果
The effect of 2ccPA on primary glial cells
○中島 進吾[1]、後藤 真里[2]、深澤 桂子[1]、室伏 擴[1]、諸星 俊郎[3]、室伏 きみ子[1] ([1]お茶大ヒューマンウェルフェア、[2]お茶大ヒューマンライフ、[3]SANSHO 株式会社)
○Shingo NAKAJIMA[1], Mari GOTOH[2], Keiko FUKASAWA[1], Hiromu MUROFUSHI[1], Toshiro Morohoshi[3], Kimiko Murofushi[1] ([1]Ochanomizu Univ. HWS, [2]Ochanomizu Univ. HLI, [3]SANSHO Co., Ltd.)

＜背景＞
多発性硬化症は髄鞘の損傷を特徴とする難病の一つであるが、免疫抑制剤などの対症療法が治療の中心となっており、脱髄を防ぐ根本治療薬は開発されていない。Cyclic Phosphatidic acid (cPA)は、sn-2 位と sn-3 位に環状リン酸基を持つ Lysophosphatidic acid (LPA)に類似したリン脂質の一種であり、神経細胞の生存、がん細胞の浸潤・転移抑制など多様な生理作用を発揮する。我々は、実験的な多発性硬化症モデルにおいて、cPA および cPA の sn-2 位に結合した酸素原子をメチル基で置き換えた 2-carba-cPA (2ccPA) がミエリン損傷を改善することを明らかにした。しかしながら、これらの生理活性脂質がグリア細胞に直接作用しているかどうかは明らかとなっていない。本研究では、初代培養アストロサイトおよびオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) を用いて、cPA および 2ccPA の生理作用について検証した。
＜方法＞
生後 1-2 日目の ICR マウスから大脳皮質を摘出し、75cm2 フラスコに混合グリア細胞を分散培養した。6-9 日後にアストロサイト上に存在する OPC を振盪培養 (220 rpm, 37 度、24 時間) により単離した。アストロサイトはトリプシンで剥がし、各種ディッシュやプレートに再度播種した。細胞の増殖・生存は、Brd U 化学発光キットおよび MTT アッセイにより評価した。細胞内のシグナル伝達はウェスタンブロッティング法により解析した。
＜結果と考察＞
LPA、cPA、2ccPA 処理によって OPC およびアストロサイトの DNA 合成が誘導された。LPA 処理によって MTT 産生の低下が見られたが、cPA、2ccPA ではその影響は見られなかった。2ccPA 処理によって ERK および Akt 経路が活性化された。U0126 の前処理により、2ccPA 誘導性の DNA 合成は抑制された。2ccPA は酸化ストレス誘導性の細胞死を緩和した。以上のことから、2ccPA はミトコンドリア代謝に影響を及ぼさずに ERK 経路を介して細胞増殖を誘導し、酸化ストレスに対する保護効果を発揮することが明らかとなった。

glial cells, 2ccPA, cell growth

発表責任者：中島進吾（nakajima.shingo@ocha.ac.jp）

講演番号：3A02p09
講演日時：3 月 19 日 16:10～ A 校舎 02 会場

Notch シグナルによってマスト細胞が獲得する抗原提示細胞様の形質
Mast cells acquire an antigen-presenting cell-like phenotype by Notch signaling
○中野 信浩[1]、西山 千春[1,2]、奥村 康[1]、小川 秀興[1] ([1]順天堂大院・医、[2]東京理科大・基礎工)
○Nobuhiro NAKANO[1], Chiharu NISHIYAMA[1,2], Ko OKUMURA[1], Hideoki OGAWA[1] ([1]Juntendo Univ., [2]Tokyo Univ. of Science)

【背景】最近我々は、Notch 受容体を介したシグナルが腸管マスト細胞の分化に関与していることを明らかにした。加えて、Notch シグナルがマスト細胞に MHC class II 分子の発現を誘導することも見いだしている。これらの結果から、腸管のマスト細胞は MHC class II 分子を発現していると予想される。腸管には数種類の腸管特異的な抗原提示細胞が存在しており、食物や常在菌に対する免疫寛容及び病原菌に対する免疫応答を制御している。これらの抗原提示細胞には細胞表面にケモカイン受容体 CX3CR1 や接着分子 CD103 を発現しているものがあり、それぞれが持つ特徴的な機能に関与していると考えられている。しかし、腸管マスト細胞がこれらの分子を発現しているかどうかは明らかでない。
【目的】マウス腸管のマスト細胞が抗原提示細胞様の形質を持つことを示し、それらの形質が Notch シグナルによって付与されるかどうか検討した。
【方法及び結果】BALB/c マウスを用いて食物アレルギーモデルを作製し、小腸のマスト細胞をフローサイトメトリーにて解析した。無処置マウスの腸管マスト細胞のうち、約 15%は MHC class II と CX3CR1 をともに発現していた。食物抗原投与により炎症を惹起させると、腸管マスト細胞数が増加し、MHC class II$^+$CX3CR1$^+$マスト細胞の割合も約 31%に増加した。次に、*in vitro* 環境下でマウス骨髄細胞から作製したマスト細胞（bone marrow-derived mast cell, BMMC）を Notch リガンド存在下で培養し、細胞表面に発現する分子を解析した。Notch リガンド存在下で培養された BMMC の約 22%が MHC class II と CX3CR1 をともに発現しており、この割合は、Notch シグナル阻害剤の添加により顕著に低下したことから、これらの分子は Notch シグナル依存的に発現が誘導されたと考えられた。さらに、MHC class II$^+$CX3CR1$^+$ BMMC を卵白アルブミン（OVA）存在下で培養した後、OVA 特異的 TCR トランスジェニックマウス DO11.10 から分取した CD4$^+$ T 細胞と共培養させると、T 細胞増殖を誘導したことから、この BMMC が *in vitro* 環境下で抗原提示能を持つことが示された。
【結論】マウス腸管に存在する一部マスト細胞は腸管特異的な抗原提示細胞様の形質を持っていた。*In vitro* 環境下において、BMMC を Notch リガンド存在下で培養すると、腸管の抗原提示細胞様の形質を持ち抗原提示能のあるマスト細胞が誘導された。

Notch signaling, Mast cell, Antigen presenting cell

発表責任者：中野信浩（nbnakano@juntendo.ac.jp）

講演番号：3A02p10
講演日時：3 月 19 日 16:25～ A 校舎 02 会場

シアル酸認識レクチンシグレック F のマウスマクロファージにおける発現調節
Regulation of Siglec F expression in mouse macrophages
樋口 廣士、村瀬 佑介、立山 博之、○西島 謙一、飯島 信司 (名大工)
Hiroshi Higuchi, Yusuke Murase, Hiroyuki Tateyama, ○Ken-ichi Nishijima, Shinji Iijima (Nagoya Univ)

【目的】
動物細胞表面を覆う糖鎖の末端は主に負電荷を持つシアル酸である。通常シアル酸は高等生物にのみ存在し、免疫学的自己･非自己の識別に関わる例が知られている。シグレックは主に免疫系の細胞表面に発現しているレクチンで、シアル酸含有糖鎖を特異的に認識する。その多くは細胞内ドメインに Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif（ITIM）と呼ばれる抑制性のチロシンモチーフをもち、免疫系を制御する活性が報告されている。我々は、マウスマクロファージ細胞株 RAW264 をモデル系として用いることで、シグレック-9,-5 が LPS などの TLR リガンドにより誘導されるマクロファージの炎症性サイトカイン産生を抑制することを報告してきた。一方、シグレックの発現制御については未解明の点が多い。本発表では、好酸球で高発現するシグレック F がマクロファージでも誘導発現される可能性について検討した。

【方法および結果】
マウス骨髄細胞を M-CSF 存在下培養することによりマクロファージを調製した。LPS などの炎症誘導物質や IL-4 などのサイトカインにより刺激した後、シグレックの発現を定量 RT-PCR により測定した。その結果、GM-CSF の刺激によりシグレック F が有意に上昇することが示された。程度は弱いものの IL-4 によっても発現上昇が認められた。既報通りシグレック E は LPS により誘導される一方、シグレック F は LPS により低下することが認められ、シグレックにより発現制御が異なることが示唆された。さらに、GM-CSF により細胞表面のシグレック F 発現が上昇していることがフローサイトメーターによる解析で確認された。次に、チオグリコレートを腹腔に注入跡腹腔より回収した細胞から CD11b および F4/80 陽性画分をソーティングし、マクロファージを得た。この細胞においても GM-CSF 刺激はシグレック F の発現を誘導したことから、GM-CSF によるシグレック F 発現誘導は、体内に存在するマクロファージにも共通した性質であることが推定された。
次に、マクロファージにおけるシグレック F の役割を明らかとするために、siRNA によりシグレック F をノックダウンした後、細胞を IL-4 で刺激した。IL-4 により誘導される STAT6 のリン酸化を調べたところ、ノックダウンによりリン酸化が減弱することが認められた。これらのことから、シグレック F が末梢マクロファージの機能を調節している可能性が示唆された。

Sialic acid, Macrophage, Siglec

発表責任者：西島謙一（nishijma@nubio.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3A02p11
講演日時：3 月 19 日 16:50～ A 校舎 02 会場

# ヒト免疫グロブリン療法による B 細胞依存的細胞凝集を伴うリンパ球増殖抑制能の解析

# Anti-inflammatory Intravenous Immunoglobulin Suppresses Lymphocyte Proliferation with B cell Aggregation

○堀 采音、藤村 孝志、河本 正次（広大院・先端）
○Ayane HORI, Takashi FUJIMURA, Seiji KAWAMOTO (Grad. Sch. ADSM, Hiroshima Univ.)

【背景・目的】急性感染症並びに自己免疫疾患の治療法として、健常者由来の免疫グロブリン画分を主成分とする免疫グロブリン製剤（IVIg）を大量投与する免疫グロブリン療法が行われている。免疫グロブリン療法の免疫抑制機能は臨床およびマウス実験において証明されているが、その正確な作用機序は未だ明らかとなっていない。そこで、本研究ではヒト免疫グロブリン療法における免疫抑制作用機序を IVIg 並びにマウスの脾細胞を用いて解明することを目的とした。

【方法・結果】マウス脾細胞を免疫賦活物質で刺激すると免疫細胞の細胞増殖が誘導される。そこで、免疫賦活物質により誘導された細胞増殖に対する増殖抑制活性を指標として、IVIg の免疫抑制能を解析した。免疫賦活物質として、固相化抗 CD3 抗体、フィトヘマグルチニン（PHA）、リポポリサッカライド（LPS）を使用し、細胞増殖は BrdU の細胞内取り込み量を指標として解析した。免疫賦活物質非存在下の定常状態において、マウス脾細胞に IVIg を添加した結果、陰性対象であるヒトアルブミンおよび生理食塩水添加と比較して細胞増殖が抑制された。更に IVIg 添加後、IVIg 特異的に *in vitro* において脾細胞の凝集が確認された。IVIg により誘導される細胞凝集の責任細胞を解析した結果、B 細胞を除去した脾細胞では IVIg による細胞凝集は誘導されず、IVIg による脾細胞の増殖抑制能も減弱していた。次に、脾細胞を抗 CD3 抗体、PHA、LPS 刺激下での IVIg による増殖抑制活性を調べた結果、抗 CD3 抗体と PHA 刺激下では IVIg による増殖抑制活性が確認できたが、LPS 刺激下では増殖抑制活性は見られなかった。そこで IVIg による増殖抑制活性における T 細胞及び B 細胞の依存性を解析した結果、PHA 刺激下では IVIg により T 細胞および B 細胞のどちらの細胞増殖も抑制されていたが、両細胞存在下で協調的抑制活性増強は見られなかった。一方で、抗 CD3 抗体刺激下では IVIg が T 細胞と B 細胞のどちらの細胞増殖も抑制したのに加え、両細胞の存在下で協調的な増殖抑制活性の増強が見られた。

【結論】IVIg により、定常状態並びに免疫賦活物質存在下において B 細胞依存的細胞凝集が誘導されることを明らかとした。また、IVIg の免疫抑制機序は免疫賦活物質の違いにより異なることが示唆された。

Intravenous immunoglobulin, Aggregation, Inflammation

発表責任者：河本正次（skawa@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：3A02p12
講演日時：3 月 19 日 17:05～ A 校舎 02 会場

# 卵膜形成における ZP1－ZP3 間相互作用と ZP1 の構造変化

# Biochemical Analyses of ZP1 Structural Change During ZP1-ZP3 Interactions in the Egg-coat Formation

○奥村 裕紀[1]、武田 祐真[1]、栗山 亘[1]、松田 幹[2]、氏田 稔[1] ([1]名城大農、[2]名大農)
○Hiroki OKUMURA[1], Yuuma TAKEDA[1], Wataru KURIYAMA[1], Tsukasa MATSUDA[2], Minoru UJITA[1] ([1]Meijo Univ., [2]Nagoya Univ.)

卵膜、あるいは哺乳類における透明帯 (zona pellucida; ZP) は、脊椎動物の卵細胞の表面を覆う特殊な細胞外マトリックスである。卵膜は、精子が卵細胞と融合する直前に接触・通過する構造物であり、精子先体反応の誘導や多精拒否に関与することなどから、脊椎動物の受精および初期発生において重要な役割をもつと考えられている。私たちは、哺乳類とは異なる生殖戦略を進化させた鳥類の卵膜に着目し、脊椎動物に保存された、あるいは鳥類に特徴的な卵膜の形成機構や機能を分子レベルで解明することを目指している。近年、卵膜を構成する ZP 糖タンパク質のひとつ ZP3 の立体構造が解明され (Han, Monné, Okumura *et al*., *Cell*, 2010)、卵膜の形成機構や機能の研究に分子構造情報を利用することが可能となった。私たちは、解明された ZP3 の構造情報に基づいて ZP 糖タンパク質のドメイン特異的組換えタンパク質や抗体を作製し、それらをプローブとした分子間相互作用解析の結果から、卵膜マトリックスの分子構造モデルを構築した (Okumura *et al*., *FEBS Open Bio*, 2015)。

本研究では、卵膜形成の分子メカニズムを解明することを目的とした。これまでの研究では、ニワトリ卵膜を構成する ZP 糖タンパク質 ZP1 と ZP3 について、卵膜から精製された ZP1 または血液中に存在し卵膜に組込まれる前の ZP1 と、卵膜から精製された ZP3 または哺乳類培養細胞株に発現させた組換え型 ZP3 とを親水処理された細胞培養用ディッシュ内やスライドガラス上で混合しインキュベートした。その結果、両分子が自己集合的に複合体や微細繊維を形成し、さらに血液中では抑制されている ZP1 の分子間ジスルフィド結合の形成が促進された (Okumura *et al*., *Biol. Reprod*., 2007 and *BBRC*., 2007)。そこで本研究では、ニワトリ血清から粗精製された ZP1 と卵膜から精製された ZP3 とをタンパク質低吸着性のチューブ内で混合しインキュベートした。その結果、ZP1 の分子間ジスルフィド結合は形成されなかった。一方、ニトロセルロース膜の小片に ZP3 を吸着させ、そこへ ZP1 を同様に反応させた結果、インキュベート時間の経過に伴って、ZP1 の分子間ジスルフィド結合の形成が確認された。以上より、ZP1 はクラスター化された ZP3 と相互作用することによって分子間ジスルフィド結合を形成することが示唆された。よって、鳥類において血液中を卵巣まで輸送された ZP1 は、卵巣の顆粒膜細胞から分泌される際に細胞膜上でクラスターを形成した ZP3 または卵膜マトリックスに組込まれた ZP3 と相互作用することによって、分子間ジスルフィド結合を形成すると考えられた。本研究では、血液中の ZP1 やドメイン特異的な組換え ZP1 を固定化した担体を用いて ZP3 との相互作用解析も行ったので、上記の研究結果と合わせて報告する。

zona pellucida, extracellular matrix, intermolecular disulfide bond

発表責任者：奥村 裕紀（hokumura@meijo-u.ac.jp）

講演番号：3A02p13
講演日時：3 月 19 日 17:20～ A 校舎 02 会場

# コンドロイチン硫酸はマウス前駆軟骨細胞の Alkaline phosphatase 活性を阻害する
# Chondroitin sulfate inhibits alkaline phosphatase activity in chondrocytes

○工藤 俊也、中谷 祥恵、柿崎 美里、新井 愛衣、和田 裕政、古旗 賢二（城西大院・薬）
○Toshiya Kudou, Sachie Nakatani, Misato Kakizaki, Ai Arai, Masahiro Wada, Kenji Kobata (Josai Univ.)

【目的】コンドロイチン硫酸（CS）は軟骨細胞が産生する硫酸化グリコサミノグリカン（GAG）の一種である。Alkaline phosphatase（ALP）は軟骨細胞の石灰化に関わる重要な酵素である。近年、CS が種々のタンパク質と相互作用してその機能に影響を与えることが報告されている。本研究では、マウス前駆軟骨細胞株 ATDC5 の ALP に及ぼす CS の影響を解明する目的で、ALP 酵素活性、ALP mRNA 発現の評価を行った。同時に、CS が ATDC5 の GAG 量および石灰化に与える影響の評価も行った。
【方法】CS は鮫由来の平均分子量 113 kDa を用いた。ATDC5 を CS（1 mg/mL）存在下で 0, 4, 7, 14 日間培養後、ALP 活性を活性染色法、ALP mRNA 発現レベルを RT-PCR 法により評価した。硫酸化 GAG 量は Alcian blue（AB）染色（pH1.0）法により評価した。また、CS 存在下で培養した ATDC5 を Chondroitinase ABC（CSase, 5 mU）で処理後、ALP 活性染色を行った。一方、ATDC5 を CS または ALP の阻害剤である L-homoarginine（hArg, 10 mM）存在下で 37 日間培養後、細胞の石灰化を Alizarin red（AR）染色により評価した。
【結果】CS 添加では培養 4, 7, 14 日目において、CS 無添加と比べて ALP の酵素活性は有意に低値を示したが、ALP mRNA 発現レベルでは差がなかった。この CS 存在下で培養した軟骨細胞においては硫酸基特異的 GAG が顕著に検出された。この細胞を CSase 処理した直後に ALP の酵素活性を評価したところ、CS 非存在下と同じく、高い ALP 活性を示した。CS および hArg は軟骨細胞の石灰化を有意に抑制した。
【考察】CS は ALP の酵素活性を抑制したが、ALP mRNA 発現レベルに影響を与えなかったことより、遺伝子発現を介さずに酵素活性を阻害すると考えられた。CS の継続的な添加では、細胞表面上に CS が高濃度に蓄積していた。蓄積した CS を CSase で分解すると、ALP 活性が CS 非存在下と同程度まで上昇した。つまり、CS が軟骨細胞表面に豊富に存在する条件下では、ALP タンパク質に CS が直接作用して、その酵素活性を阻害したと考えられた。CS は軟骨細胞の石灰化を抑制したが、ALP 阻害剤も同様に軟骨細胞の石灰化を抑制した。以上のことから、CS は ALP を直接的に阻害する事で軟骨細胞の石灰化を抑制することが示された。

chondroitin sulfate, chondrocyte, alkaline phosphatase

講演番号：3A02p14
講演日時：3 月 19 日 17:35～ A 校舎 02 会場

霊長類味蕾オルガノイド培養系の確立
Generation of taste organoid from primates
○岩槻 健[1]、難波 みつき[1]、熊木 竣佑[1]、大木 淳子[1]、今井 啓雄[2]、山根 拓実[1]、大石 祐一[1]([1]東農大応生、[2]京大霊長研)
○Ken IWATSUKI[1], Mitsuki NAMBA[1], Shunsuke KUMAKI[1], Junko OHKI[1], Hiroo IMAI[2], Takumi YAMANE[1], Yuichi OISHI[1] ([1]Tokyo Univ. Agri., [2]Kyoto Univ.)

【背景・目的】味細胞は10～14日で再生を繰り返す細胞であり、新たに生ずる細胞は常に味蕾周辺の味幹細胞から生じ、最終的に5種類の味質（甘味、うま味、苦味、塩味、酸味）に反応する味細胞へ分化する。味細胞研究の多くは、げっ歯類をモデル動物とし、呈味物質と受容体との相互作用の研究や行動学などの研究が進んできた。しかし、近年のゲノム情報の開示により、ヒトやサルなどの霊長類とげっ歯類との間には、味覚受容体の数や構造にかなりの違いがある事が分かってきた。すなわち、呈味物質のそれぞれの受容体に対する反応特性は霊長類とげっ歯類では異なる事が多く、ヒトをはじめとする霊長類の味覚を研究するならば、霊長類由来の味細胞を用いたアッセイ系の確立が望まれている。そこで、本研究ではこれまでに存在しなかった霊長類の味蕾細胞培養系を作製し、霊長類独特の味覚について解析できる系を構築する事を目的とした。

【方法】我々はこれまでげっ歯類において、Lgr5陽性細胞より味蕾の三次元幹細胞培養系である味蕾オルガノイドを作製してきた（参考文献）。今回、京都大学霊長類研究所の協力のもと、ニホンザルの舌より有郭乳頭を含む上皮および真皮を採取しサンプルとした。同サンプルをTrypsin-EDTAにて消化後、マトリジェルに包埋し、報告されているヒト消化管オルガノイド作製用の培地を参考に、Wnt活性の高い培養液を重層し、細胞の成長の様子と味細胞や増殖マーカーの発現について調べた。

【結果・考察】培養 5 日目には増殖する細胞塊が観察され、継代を繰り返しながら少なくとも 3 ヶ月間は同様の状態で細胞は維持されている。味細胞マーカーの PLCbeta2、増殖マーカーの Ki67 に対する免疫染色では、オルガノイドの外側に Ki67 が、内側に PLCbeta2 の発現が観察され両者の共発現は見られなかった。形態学的 PLCbeta2 陽性細胞は味蕾内に存在する味細胞と酷似していた。呈味物質を用いた Ca イメージングでは、うま味、苦味、甘味に反応する事が分かった。

本研究は、霊長類において味蕾オルガノイド作製に成功した世界初の例である。同オルガノイドは、味細胞の形態を示す味細胞マーカー分子を発現する事、呈味物質に反応する事、継代しながら 3 ヶ月以上に及ぶ培養が可能であった事などから、味蕾幹細胞と味細胞に分化した細胞の集団であると結論づけた。本味蕾オルガノイドは食品の安全性や評価、そして再生医療の基盤研究にも貢献すると考えられ、今後、我々霊長類の味覚を研究する上で有用なツールとなると期待される。

参考文献：Ren W *et al.* PNAS, 111, 16401-16406 (2014)

taste cell, stem cell, primate

発表責任者：岩槻　健（ki204886@nodai.ac.jp）

講演番号：3A02p15
講演日時：3 月 19 日 17:50～ A 校舎 02 会場

# 標的 RNA 配列特異的に結合する人工 PUF タンパク質のスクリーニングシステムの確立

# Establishment of screening system for artificial PUF protein specifically binding to target RNA sequence

○原 知明、森下 しおみ、戸川 剛志、前田 遥香、進藤 彰子、世良 貴史（岡大工）
○Tomoaki Hara, Shiomi Morishita, Tsuyoshi Togawa, Haruka Maeda, Akiko Shindo, Takashi Sera (Okayama Univ.)

Pumilio/FBF（PUF）タンパク質は酵母、哺乳類および植物などで保存されている RNA 結合タンパク質であり、標的 mRNA に結合しその翻訳を制御している。ヒト PUF（hPUF）の 1 つである PUM1（human Pumilio 1 homology domain）は神経細胞の活動、ERK シグナル、生殖細胞の発生において重要な役割を果たしている。PUF はリピート 1（R1）からリピート 8（R8）までの 8 つの繰り返しの RNA 結合ドメイン(R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8）を持ち、それぞれ独立して 1 塩基の RNA と結合する。各リピートはそれぞれ 36 アミノ酸で 3 つの α-ヘリックスを形成し、8 つの連続した塩基と結合する。その結合配列は 5’-UGUAUAUA-3’ であり、Nanos response element（NRE）と呼ばれている。X 線結晶構造解析により、各リピートの 12 番目と 16 番目の位置にあるアミノ酸が、水素結合やファンデルワールス力により標的 RNA 塩基と結合し、13 番目の位置にあるアミノ酸が、標的 RNA 塩基間に入り込みスタッキング相互作用を形成していることが確認されている。

結合配列や RNA と相互作用するアミノ酸の部位が決定されていることから、合成生物学分野において PUF を利用した分子デバイスの開発が期待されている。これまでの研究では、PUF の結合により翻訳が抑制される翻訳制御スイッチや、ウイルス RNA を切断する RNase と PUF の融合タンパク質の開発が行われてきた。しかしその標的 RNA は NRE 配列に限られている。そこで変異 NRE 配列に結合できる PUF 変異体を作製し、任意の 8 塩基を標的配列とする分子デバイスの構築に利用しようと考えた。PUF は各リピートの 12、13、16 番目の位置で RNA と相互作用していることから、そのアミノ酸をランダム化し、セレクションにより変異 NRE 配列に結合する PUF 変異体の取得を試みることにした。

まず、NRE 配列を 5’ UTR（非翻訳領域）に 3 つ組み込んだ GFP 発現レポータープラスミドおよび hPUF 発現プラスミドを作製した。両者を HEK293T 細胞に導入し、GFP の蛍光強度をセルソーターで測定したところ、hPUF 発現プラスミドの量依存的に蛍光強度が低下した。変異 NRE 配列（A4U）の場合では NRE 配列の場合よりも蛍光強度の低下が緩やかであった。次に hPUF の R5 の 12、13、16 番目のアミノ酸をランダム化した PUF 変異体発現プラスミドライブラリーを作製し、NRE または変異 NRE（A4U）レポータープラスミドと共に HEK293T 細胞に導入し、蛍光強度の低い細胞を回収した。PCR によりランダム化領域を増幅し再び PUF 変異体発現プラスミドライブラリーを作製した。この過程を繰り返し、標的配列により強く結合する PUF 変異体を取得する。

Pumilio/FBF (PUF), synthetic biology, selection

講演番号：3A02p16
講演日時：3 月 19 日 18:05～ A 校舎 02 会場

能動的標的化能をもつ抗体提示型バイオナノカプセルの高効率細胞内取り込みメカニズム
Mechanism of high cellular uptake efficiency of bio-nanocapsule equipped with immunoglobulin for an active targeting drug delivery system
○李 昊、立松 健司、黒田 俊一（大阪大学産業科学研究所）
○Hao LI, Kenji TATEMATSU, Shun'ichi KURODA (ISIR, Osaka Univ.)

バイオナノカプセル（BNC）は、B 型肝炎ウイルスの外皮 L タンパク質を出芽酵母で発現することにより得られた直径約 30 nm の中空ナノ粒子で、B 型肝炎ウイルスと同様のメカニズムでヒト肝臓に対して特異的な送達が可能なドラッグデリバリーシステムである（山田ら、*Nat. Biotech.* 2003）。この肝臓特異性をになう L タンパク質の N 末端側配列を抗体の Fc 領域に結合する *Staphylococcus aureus* protein A 由来のドメイン Z タンデム配列に置換した ZZ-BNC を作製し、これに標的臓器に特異的な抗体を結合することにより能動的な標的臓器送達についても成功している。しかしながら、Z ドメインに結合できる抗体は、動物種、クラス、サブクラスが比較的に限定されていることが弱点であった。そこで、より幅広い抗体種と結合可能な BNC を創生するために、protein A よりも多様な動物種の IgG Fc に結合できる *Streptococcus* protein G、および様々なクラスの抗体の Fv（IgG, IgM, IgE, IgA, and IgD）に結合する *Finegoldia magna* protein L に着目し、それぞれの抗体結合ドメインをタンデムに結合した GL-BNC を作成した。その抗体結合能を検証したところ狙い通りに幅広い抗体種と結合することが示された。つぎに抗 EGFR 抗体提示型の GL-BNC について、EGFR を高発現するヒト扁平上皮癌由来 A431 細胞への in vitro 送達をフローサイトメーターおよび共焦点レーザー顕微鏡により解析した。その結果、GL-BNC と ZZ-BNC は同様に抗 EGFR 抗体による特異的な標的化能を示したうえ、特に GL-BNC の場合は ZZ-BNC より非常に高いレベルの細胞内取り込み量が観察された。この現象を解明するために、GL または ZZ ドメインをリポソームに提示して上記と同様の送達実験を行ったところ、抗体を提示させた GL-Liposome と ZZ-Liposome の取り込み量に有意差はなかった。すなわち、GL および ZZ ドメイン自体の構造や、抗体結合様式の違いは取り込み量には影響せず、BNC の機能ドメインと抗体のトポロジーがカギを握っていると考えられた。GL-BNC の画期的な細胞内取り込み能力の機構を解明するために、現在 GL-BNC と ZZ-BNC の細胞内取り込み経路の比較検討を行っており、本大会において報告する。

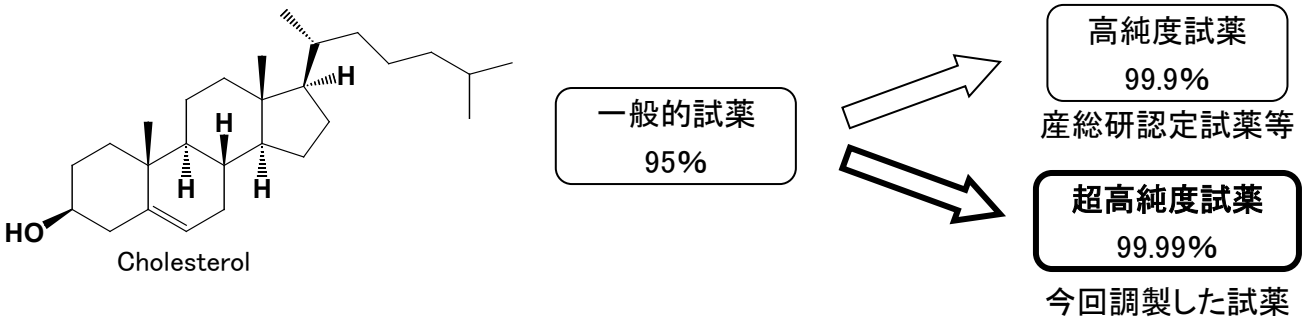
drug delivery system, antibody, virus

講演番号：3A03a01
講演日時：3 月 19 日 09:20～ A 校舎 03 会場

高純度コレステロールの生産
Preparation of extra pure Cholesterol
○石野 暢好、中塚 宏志、中塚 進一 (長良サイエンス株式会社)
○Nobutyoshi ISHINO, Hiroshi NAKATSUKA, Shin-ichi NAKATSUKA (Nagara Science Co., Ltd.)

ステロイド系化合物は生体の生命現象において様々な役割を担う重要な化合物で、コレステロールはその主要なひとつであり広い分野で利用されているが、類似の化合物群が混在するため分離が困難である。市販のコレステロール試薬の純度は 95%前後で、正確な生理作用などを解明するうえで十分とは言えない。高純度試薬としては産業技術総合研究所により認定された純度 99.9%の試薬が販売されているが価格は一般試薬と比較して約 2000 倍と高価である。ステロイド類の強い生理作用のために、0.1%以下の不純物を排除した高純度試薬が必要となっている。そこで、本研究では高純度コレステロールの製法を再検討し、安価な高純度試薬の供給を目指した。

我々は以前よりコレステロールの前駆体や類縁体をラノリン(羊毛脂)から分離精製し 99.5%以上の純度で生産することに成功している [1, 2]。それらの精製技術と、カラムクロマト、溶媒抽出、結晶化法などを組み合わせて、安価なコレステロール原料から HPLC 法で 99.99%純度のコレステロールを 10g スケールでの生産に成功した。なお、UV 吸収のほとんどないステロイド化合物の定量は当研究グループが開発した UV エンド吸収法 [3]により行った。なお、これまでステロイドの定量には GC 法が一般的ではあるが、気化し難い化合物が共存する可能性を考えると、すべての化合物が溶けた状態で分析を行う HPLC 法の方がより正確であると考えて研究を進めた。




1) 中塚ら，日本農芸化学会 中部支部 第 177 回例会 講演要旨集，p.24.
2) 中塚ら，日本農芸化学会 中部支部 第 177 回例会 講演要旨集，p.25.
3) 松本恵実，中塚進一, *FOOD Style 21*, **17**(3), 87-89 (2013).

cholesterol, steroid, Lanolin

発表責任者：中塚進一（nagara@nsgifu.jp）

講演番号：3A03a02
講演日時：3 月 19 日 09:35～ A 校舎 03 会場

# リシン欠乏飼料を用いた魚類筋肉における n-3 系脂肪酸の効率的な蓄積技術

Accumulation of n-3 fatty acids in fish muscle by lysine-deficient diet feeding

○吉永 葉月[1]、潮 秀樹[1]、高橋 伸一郎[1]、芳賀 穣[2]、佐藤 秀一[2]([1]東大院農、[2]海洋大)
○Hazuki YOSHINAGA[1], Hideki USHIO[1], Shin-Ichiro TAKAHASHI[1], Yutaka HAGA[2], Shuichi SATOH[2] ([1]Tokyo Univ., [2]Tokyo University of Marine Science and Technology)

【背景・目的】
n-3 系脂肪酸が抗炎症作用や抗血栓作用などの健康機能を発揮し、魚肉は畜肉に比べて n-3 系脂肪酸の含有量が高いため、魚食の有用性が示唆されている。一方、天然資源の枯渇により、魚食を支える魚類養殖の重要性が高まっている。しかしながら、養殖魚ではその筋肉に n-3 系脂肪酸を蓄積させるためには多量の魚油を配合した飼料が必要であり、n-3 系脂肪酸を蓄積する新しい手法の開発が必要とされている。これまでに、演者らはニジマスに対するリシン欠乏飼料の短期投与が、筋肉のトリアシルグリセロール（TAG）含有量の有意な増加を引き起こすことを明らかにした。本研究においては、リシン欠乏時の脂肪酸組成の変化を解析し、リシン欠乏飼料が n-3 系脂肪酸含量に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。
【方法】
魚粉およびコーングルテンミールを主タンパク質源として、対照飼料とリシン欠乏飼料を作製し、ニジマス *Oncorhynchus mykiss* の飼育試験を行った（n=5)。これらの飼料には大豆油および魚油を対照飼料には 1: 0.5、リシン欠乏飼料には 1: 0.74 の割合で配合し、魚油の使用を低減するとともに、魚粉由来の脂肪酸を加味して脂肪酸組成がそろうように飼料を設計した。対照飼料での 5 日間の飼育後にリシン欠乏飼料を 4 日間投与し、魚体から筋肉および肝臓を採取した。組織から Bligh and Dyer 法を用いて総脂質を抽出し、重量法での総脂質含量の測定および GC-FID を用いた脂肪酸組成の解析に供した。
【結果・考察】
リシン欠乏飼料投与による体長および体重の変化はなく、筋肉総脂質含量の増加が見られ、既報の結果と一致した。脂肪酸分析の結果、4 日間のリシン欠乏飼料投与によってニジマスの筋肉における n-3 系脂肪酸の含有量が有意に増加した。特に魚肉の栄養成分として注目されている n-3 系長鎖不飽和脂肪酸である 22:6n-3（DHA）は増加の傾向を示し、22:5n-3（DPA）は有意に増加した。魚類筋肉の脂肪酸組成には飼料の脂肪酸組成が強く反映されるが、本試験ではリシン欠乏飼料と対照飼料の n-3 系脂肪酸の含有量に差がなかった。よって、リシン欠乏飼料がニジマス筋肉における効率的な n-3 系脂肪酸の蓄積を引き起こすと結論した。本法は、魚類養殖における n-3 系脂肪酸の蓄積技術として有用である。

n-3 fatty acids, aquaculture, lysine-deficient diet

講演番号：3A03a03
講演日時：3 月 19 日 09:50～ A 校舎 03 会場

高純度オメガ-3 ドコサペンタエン酸（DPA）のイコサペンタエン酸（EPA）からの化学合成
Chemical synthesis of highly pure omega-3 docosapentaenoic acid from eicosapentaenoic acid ethyl ester
○田畑 宏、対馬 忠広、藤井 淳、平 哲郎、斎藤 志保、三宅 和弘、三澤 嘉久、大谷 昌士、馬場 直道（備前化成株式会社）
○ HIROSHI TABATA, TADAHIRO TSUSHIMA, JYUN FUJII, TETSURO TAIRA, SHIHO SAITOU, KAZUHIRO MIYAKE, YOSHIHISA MISAWA, MASASHI OTANI, NAOMICHI BABA (Bizen Chemical Co., Ltd.)

## 背景

DHA や EPA は魚油に含まれる主な omega-3 脂肪酸であり、その顕著な生体機能は医薬・機能性食品素材として近年ますますクローズアップされている。一方、魚油には微量成分の一つとしてドコサペンタエン酸(DPA)が含まれ、DHA や EPA とは異なる種々の機能を有する。例えば omega-3 DPA の顕著な血小板凝集抑制、脂質代謝促進、炎症抑制、老齢ラットの脳機能改善、さらに最近では、結腸ガンモデルに対する細胞増殖抑制・アポトーシス促進作用等が含まれる。また、DPA は脳や母乳に多く含まれるが、その理由は明らかにされていない。以上のような特徴と重要性にも関わらず高純度 DPA を魚油から得るには高度の技術と設備が必要である。そのため、いくつかの化学合成法が報告されているが、試薬の安全性・操作の煩雑性などから大量合成には適していない。古典的なマロン酸エステル合成法もあるが、最終段階で加水分解・脱炭酸・再エステル化が必要であり、収率、効率は満足のいくものではない。本研究では、マロン酸エステル合成のステップを変更・改善する事によって、最終的に遊離脂肪酸ではなく DPA エチルエステルとして高純度品を得る方法を開発した。

## 方法

98%以上の純度を有するEPAエチルエステルをリチウムアルミニウムヒドリド還元（LAH還元）によってアルコールとし、メタンスルホン酸エステルを経由してヨウ化物に変換し、カラム精製を行った。これをマロン酸エステル誘導体に変換し、カラム精製の後、プロピオン酸溶液として窒素雰囲気下、48時間加熱還流した。プロピオン酸を除去した残渣をシリカゲルカラムにより精製し、98 - 99%純度のDPAエチルエステルを得る事ができた。

## 結果と考察

従来のマロン酸エステル合成法では、マロン酸エステル誘導体の加水分解・脱炭酸・必要に応じて再エステル化を行う必要があり、手間がかかるのみならず多価不飽和脂肪酸を痛める。本方法ではDPAエチルエステルがマロン酸エステル誘導体からone-stepで得られ、従来の方法と比較して、高純度品の大量合成に適している事から、今後、研究・実用に大きく寄与すると思われる。

Docosapentaenoic acid, Polyunsaturated fatty acid, Chemical synthesis

発表責任者：馬場　直道（babanaom-10@bizen-c.co.jp）

講演番号：3A03a04
講演日時：3 月 19 日 10:05～ A 校舎 03 会場

# ヨメガカサガイ（*Cellana toreuma*）の卵巣に由来する新規な奇数鎖ジエン酸の構造

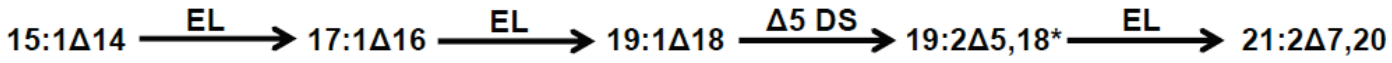
# Identification of novel odd-chain fatty acids in ovaries of the limpet *Cellana toreuma*

○川島 英城（岩手県立大宮古短大部）
○Hideki Kawashima (Iwate Pref. Univ.)

【目的】アワビに類縁なガカサガイ（*Cellana grata*、 *Cellana toreuma*、*Collisella dorsuosa*）の卵巣には、ユニークな非メチレン中断型脂肪酸（多様な異性体を含む炭素数 16～24）が多数存在する。[1,2] この不飽和脂肪酸は二重結合間にメチレン基を 2 個以上挟んだ構造を持つ、しかし、生物活性やその機能はほとんど明らかにされていない。最近、カサガイから見いだされた非メチレン中断型脂肪酸の中で、23:2Δ9,20 はヒト急性前骨髄性白血病細胞 HL60 に対する細胞毒性や GSK-3β に対する阻害活性（*in vitro*）を示すことが初めて明らかになった。[3] 本研究では、ヨメガカサガイ（*C. toreuma*）の卵巣から未知のジエン酸を新たに見いだしたので、その構造並びに生合成経路の推定について、報告する。

【方法】常法に従って、採取した三陸沿岸産 *C. toreuma* の卵巣から全脂質を抽出後、分取用 TLC を用いて中性脂質・極性脂質にそれぞれ分画した。これらの画分を methyl ester 誘導体に調製後、不飽和度に応じて硝酸銀 TLC で不飽和脂肪酸 methyl ester の分取を行い、目的のジエン酸画分を得た。さらに、二重結合の位置を決定するために、得られた画分を 3-pyridylcarbinol ester 並びに pyrrolidide 誘導体に直接変換し、GC-EI-MS（70 eV）によりこれらの構造解析を行った。

【結果】分析を行った卵巣の中性脂質から、5 種類の既知奇数鎖ジエン酸 21:2Δ7,13、21:2Δ7,15、21:2Δ7,16、21:2Δ7,18、21:2Δ9,15 と共に、複数の未知ジエン酸が検出された。今回得られた EI-MS 解析結果から、未知ジエン酸のひとつ、末端二重結合を持つ新規な 21:2Δ7,20 が同定された。また、本研究では末端二重結合を持つモノエン酸アナログ（15:1Δ14、17:1Δ16）も同時に検出されたことから、これらは 21:2Δ7,20 の生合成に関与する前駆体と考えられる。以上の結果から、下図に示したとおり、15:1Δ14 は連続した C2 ユニットの伸長化（EL）、Δ5 不飽和化（Δ5 DS）、C2 ユニットの伸長化（EL）のプロセスを経て、最終的に 21:2Δ7,20 に変換されたと推定している。




*unknown

**Figure A possible biosyntetic pathway for a novel fatty acid with a terminal double bond**

(1) New Food Industry **56** (4), 1–8 (2014). (2) Lipids **51** (2), 257-262 (2016). (3)日本油化学第 55 回年会講演要旨集(P-64).

Cellana toreuma, limpet gonads, non-methylene-interrupted fatty acids

発表責任者：川島英城（ajoe@iwate-pu.ac.jp）

講演番号：3A03a05
講演日時：3 月 19 日 10:20～ A 校舎 03 会場

# 質量分析を用いた粉乳に含まれる脂質糖化産物の分析法の構築

# Analysis of glycated lipids in powdered milk using HPLC-MS/MS

○伊藤 隼哉[1]、小舘 愛[1]、乙木 百合香[1]、加藤 俊治[1]、池田 郁男[2]、宮澤 陽夫[3,4]、仲川 清隆[1] ([1]東北大院農・機能分子解析、[2] 東北大院農・食品化学、[3] 東北大・未来科学技術共同研究センター、[4] 東北大院農・食の健康科学ユニット)

○Junya ITO[1], Ai Kodate[1], Yurika OTOKI[1], Shunji KATO[1], Ikuo IKEDA[2], Teruo MIYAZAWA[3,4], Kiyotaka NAKAGAWA[1] ([1]Food and Biodynamic Chemistry Laboratory, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, [2]Laboratory of Food and Biomolecular Science, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, [3]New Industry Creation Hatchery Center (NICHe), Tohoku University, [4]Food and Health Science Research Unit, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University)

【目的】タンパク質と糖質による非酵素的褐変反応はメイラード反応と呼ばれ、食品の褐変や香りに関わる重要な反応である。従来、本反応はタンパク質と糖質などの親水性分子同士の研究がほとんどであったが、私たちは、脂質（ホスファチジルエタノールアミン; PE）と糖質の間でもメイラード反応が進行し、アマドリ型糖化脂質（アマドリ PE）が生じることを明らかにし[1]、様々な食品の中から、粉乳に比較的多くのアマドリ PE（グルコース型 Glc-PE とラクトース型 Lac-PE）が含まれることを見出した[2]。アマドリ PE は、異なる構成脂肪酸を持つ様々な分子種として、粉乳中に存在すると考えられるが、分子種を意識した解析は未だ十分に行われていない。そこで本研究では、① 粉乳に含まれる主要なアマドリ PE 分子種を特定するとともに、② これらの定量法構築を試みた。

【方法】① 粉乳に多く存在すると考えられる PE 分子種（16:0/18:1）を対象とし、これをグルコースあるいはラクトースと反応させ、HPLC で精製し、Glc-PE および Lac-PE 標品を調製した。これら標品を基準物質として、粉乳由来の総脂質を順相 HPLC-MS で分析した。② 粉乳に含まれるアマドリ PE の定量法の確立に向けて、HPLC-MS/MS による測定を試みた。測定系にナトリウムイオンを加えることで、構造解析や定量分析に有用な特徴的なフラグメントイオンを見出し、このフラグメントイオンを利用してプリカーサーイオンスキャンや MRM 分析を行った。

【結果と考察】① 粉乳中には確かにアマドリ PE が含まれ、Glc-PE と Lac-PE の主要分子種は 16:0/18:1、18:0/18:1、18:0/18:2 と判明した。② アマドリ PE を分子種ごとあるいは一斉に定量することに成功し、粉乳中の PE の約 45%が糖化されていることが明らかとなった。$^{31}$P NMR による測定も試みたところ、定量値の差は少なかったため、ナトリウムイオンの付加を利用した本法は、アマドリ PE を高精度に定量出来ると示唆された。定量が可能となったので、今後は、食品栄養学的観点から、吸収代謝を検討していきたい。

【参考文献】

[1] S. Lertsiri, M. Shiraishi, T. Miyazawa, Identification of deoxy-D-fructosyl phosphatidylethanolamine as a non-enzymic glycation product of phosphatidylethanolamine and its occurrence in human blood plasma and red blood cells. Biosci. Biotechnol. Biochem., 62, 893-901 (1988)

[2] J. Oak, K. Nakagawa, T. Miyazawa, UV analysis of Amadori-glycated phosphatidylethanolamine in foods and biological samples. J. Lipid Res., 43, 523-529 (2002)

LC-MS/MS, glycated lipid, maillard reaction

講演番号：3A03a06
講演日時：3 月 19 日 10:45～ A 校舎 03 会場

石川県の食品と農産物から分離された乳酸菌が生産する菌体外多糖の分析
Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria isolated from foods and vegetables in Ishikawa prefecture
○本多 裕司、巻田 春香、松本 健司、小柳 喬（石川県大・生資環）
○Yuji HONDA, Haruka Makida, Kenji Matsumoto, Takashi Koyanagi (Ishikawa Pref. Univ.)

【目的】
日本全国には多種多様な発酵食品が存在するが、それらの製造に乳酸菌の作用が大きく寄与しているものが多い。また、乳酸菌は食品製造に関する利用だけではなく、整腸作用などのプロバイオティクス効果も期待されている。そのような乳酸菌の中には、菌体外に多糖類を産生する菌株も存在しており、それらの菌体外多糖(EPS)自体に様々な効能があることも報告されてきている。
海と山の幸が豊富な石川県においても、地域特有の様々な食材を用いた発酵食品が製造されている。石川県立大学では、それらの発酵食品や食品素材から乳酸菌を分離して、乳酸菌ライブラリーを構築してきた[1, 2]。
本研究では、石川県で製造された漬け物と野菜から新たに乳酸菌を分離して、EPS 産生能が高い菌株を選抜した。さらに産生された EPS の組成と構造を分析することで、乳酸菌が産生する EPS を糖鎖構造の差異から分類することを目的とした。
【方法】
石川県で生産された 8 種の漬け物および 12 種の野菜から、MRS および BCP 寒天培地を用いて選択的に乳酸菌を分離した。続いて、分離した乳酸菌から DNA を抽出し、16S リボソーム RNA 遺伝子に由来する塩基配列を決定した。解読した塩基配列の情報を基にして、分離した乳酸菌の菌種を同定した。
次に、5%スクロースを含有する MRS 寒天培地に分離した乳酸菌を植菌して、乳酸菌による EPS 産生能を評価した。すなわち、乳酸菌培養後に形成されるコロニーの粘稠化を観察して、その性状の変化から EPS 産生能を評価した。EPS 産生が認められた菌株は、液体培養した後に培養液を遠心分離して上清を回収した。得られた上清にエタノールを添加して洗浄した後に、沈澱した EPS を濃縮乾固させた。得られた EPS は $D_2O$ に溶解させた後に、$^{1}$H-NMR および $^{13}$C-NMR を測定した。

【結果】本研究で得られた乳酸菌のうち、174 株の菌種を同定する事ができた。それらの菌株の半分以上が EPS を産生する事が判った。得られた EPS 産生株のほとんどが *Leuconostoc* 属であったが、*Pediococcus* 属と同定された菌株も得られた。得られた EPS を NMR で分析した結果、ほとんどの EPS は α1→3 グリコシド結合あるいは α1→6 グリコシド結合を持つデキストランであると考えられた。

現在、得られた EPS の組成や構造について、様々な分析を試みているところである。

1) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2016;**80**:399-406, 2) *Biotech. Rep.* 2016;**10**:105-110

exopolysaccharides, lactic acid bacteria, *Pediococcus*

発表責任者：本多　裕司（honda@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：3A03a07
講演日時：3 月 19 日 11:00～ A 校舎 03 会場

*Parachlorella kessleri* stratin KNK-A001(カネカクロレラ)から得られたマクロファージ刺激作用を有する多糖体に関する研究
Macrophage-stimulating activities of polysaccharides isolated from *Parachlorella kessleri* stratin KNK-A001

○上野 幹憲[1]、平田 成実[1]、山下 憲司[2]、山口 健一[1]、小田 達也[1] ([1]長崎大院・水環、[2]株式会社カネカ)
○Mikinori UENO[1], Narumi HIRATA[1], Kenji YAMASHITA[2], Kenichi YAMAGUCHI[1], Tatsuya ODA[1] ([1]Nagasaki Univ., [2]KANEKA Corp.)

【目的】*Parachlorella kessleri* stratin KNK-A001（カネカクロレラ）は排水より分離された、*P. kessleri* に類縁の単細胞緑色微細藻類であり、直径は約 10-15 μm でほぼ球形である。乾燥粉末とした KNK-A001 は、一般的なクロレラ（*Chlorella vulgaris*)と細胞形体は類似しているが、強固な細胞壁を持たず、代わりに多糖体を主成分とすると推定される糖被膜で覆われている。これまでの研究で、KNK-A001 にはマガキ稚貝(*Crassostrea gigas*)や水産養殖で広く利用されている餌料動物プランクトンであるシオミズツボワムシ(*Brachionus plicatilis*)に対する餌料効果が見出されている。さらに KNK-A001 経口投与によりクルマエビ(*Marsupenaeus japonicus*)の抗ウイルス活性が上昇する事、マウス腹腔内投与により脾臓 NK(natural killer)活性が上昇する事も観察されている。最近の *in vitro* での解析から KNK-A001 にはマクロファージ刺激作用を示す多糖体が存在している事が示唆された。そこで本研究では KNK-A001 から多糖体を分離精製し、その構造及び生物活性について解析した。
【方法】KNK-A001 を蒸留水に懸濁後、蒸留水に対して 3 日間透析し低分子画分を除去した。熱処理(121°C, 30 分)後、遠心分離より上清を得た。得られた上清を DEAE イオン交換クロマログラフィーに供し、未吸着画分が溶出した後、吸着画分を NaCl の直線濃度勾配により溶出させた。分画されたサンプルについてマウスマクロファージ株化細胞 RAW264.7 細胞に対する一酸化窒素(NO)放出誘導活性を Griess assay で測定すると共に inducible NO synthase (iNOS)発現を PCR 法と Western blot 法で解析した。腫瘍壊死因子(TNF-α)放出誘導活性は ELISA 法で測定した。
【結果及び考察】KNK-A001 から熱処理で得られた高分子分画を DEAE イオン交換クロマログラフィーに供した結果、素通り分画 F1 及び吸着分画(F2~F5)の 5 つの分画を得た。RAW264.7 細胞に対する NO 放出誘導活性を調べた結果、F5 が最も強い活性を示し、F2 にも弱いながら活性が認められた。F5 処理細胞においては mRNA 及び蛋白質レベルでの iNOS 発現の顕著な上昇が確認された。さらに F5 は TNF-αの放出も強く誘導した。F5 はゲルクロマトグラフィー解析から分子量約 30 万の高分子であると推定された。構成糖解析から galactose (33%)、galacturonic acid (17%)、glucose (16%)、rhamnose (8%)、mannose (7%)、arabinose (5%)、その他からなる多糖体である事がわかった。以上の結果から、KNK-A001 からは性質が異なる複数の多糖体が得られ、RAW264.7 細胞刺激作用の観点から F5 が最も強い活性を示す事がわかった。F5 は構成糖の特徴から新規性の高い多糖体であると推定された。今後さらに F5 の生物活性について解析したいと考えている。

*Parachlorella kessleri*, polysaccharide, macrophages

発表責任者：小田達也（t-oda@nagasaki-u.ac.jp）

講演番号：3A03a08
講演日時：3 月 19 日 11:15～ A 校舎 03 会場

腸管上皮由来フィブロネクチンと相互作用するペクチン部分構造の解明
Structural analysis of the pectin bound to fibronectin in intestinal epithelium
○中 智美、宮本 茉由、山根 菜摘、北口 公司、矢部 富雄（岐阜大・応生科）
○Tomomi NAKA, Mayu MIYAMOTO, Natsumi YAMANE, Kohji KITAGUCHI, Tomio YABE (Gifu Univ.)

【目的】
水溶性食物繊維であるペクチンは, ポリガラクツロン酸から成る主鎖と中性糖から成る側鎖で構成されている。ペクチンを摂取すると小腸絨毛の形態変化が生じることが報告されているが, その生理的意義は未だ明らかとなっていない。我々はこれまでに, ヒト腸管上皮細胞由来の細胞外マトリクス構成タンパク質であるフィブロネクチン（FN）が, ペクチン構造を認識することを報告している。そこで, 小腸絨毛形態変化の意義解明への第一歩として, FN と結合するペクチン中の分子構造を解明することを本研究の目的とした。
【方法】
プルーン（*Prunus domestica* L.）よりアルコール不溶性画分を調製したのち，陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによりプルーンペクチンを精製した。得られたペクチンに対し, 主鎖のみを分解するペクチナーゼと, 側鎖のみを分解する endo 型・exo 型のアラビナンおよびガラクタン分解酵素を, 単独あるいは組み合わせて作用させた。HPLC により酵素が作用したことを確認したのち，酵素処理後のペクチン溶液に対して透析および凍結乾燥を行った。得られた試料と FN との分子間相互作用を，表面プラズモン共鳴法（SPR）により測定した。
【結果】
FN との相互作用解析の結果，ペクチナーゼ処理ペクチンにおいても強い結合を示したことから，側鎖構造が結合に関与していると考えられた。また，アラビナンおよびガラクタンと FN との相互作用解析から，ガラクタン側鎖が結合に重要であることが示唆された。さらに，ペクチナーゼ分解ペクチンに対し，exo 型のガラクタン分解酵素を単独で作用させたペクチン，exo 型および endo 型のガラクタン分解酵素を組み合わせて作用させたペクチンは, FN と強い結合を示すものの解離定数に有意な差はなかった。このことから，分岐の位置は FN との相互作用に重要ではないことが示唆された。単糖のガラクトースのみでは FN との相互作用を示さず，β-galactosidase 処理ペクチンでは FN との結合をほとんど示さなくなることから，ペクチンの FN との結合にはガラクトースが複数結合した分岐ガラクタン側鎖が重要であることが示唆された。

pectin, galactan, intestinal villi

発表責任者：矢部富雄（yabet@gifu-u.ac.jp）

講演番号：3A03a09
講演日時：3 月 19 日 11:30～ A 校舎 03 会場

消化管機能に対するセルロースナノファイバーの生体適合性
The biocompatibility of cellulose nanofibers in the gastrointestinal functions.
○中山 裕介、山野上 実希、森島 美千代、小川 剛伸、桝田 哲哉、谷 史人（京大農）
○Yusuke NAKAYAMA, Miki YAMANOUE, Michiyo MORISHIMA, Takenobu OGAWA, Tetsuya MASUDA, Fumito TANI (Kyoto Univ.)

【目的】
植物組織より得られるセルロースを、グラインダーや化学触媒を用いた方法で処理することによって、4～20 nm のナノレベルの幅をもつセルロースナノファイバー(CNF)にまで解繊することができる。このように作製された CNF は、高い粘性や保水性などの物性をもつことが知られており、増粘剤や乳化安定剤などの食品添加物として期待される新規食品素材である。そこで、高機能性をもつ CNF の食品素材としての応用に向けて、CNF を経口摂取した際の消化管機能に対する影響と生体適合性について検証を行った。

【方法】
重量比で 3%の CNF を含有した飼料を、C57BL/6 マウスに 8 週間自由摂食させた。対照としては、通常の繊維状のセルロースを含有した飼料を用いた。マウスの体重変化と摂食量は摂食期間中、経時的に測定した。摂食 8 週間後、静脈血と糞便を採取し、血漿中の TNF-α量と糞便中のリポカリン量を炎症性パラメータとして定量した。マウスを解剖し、肝臓、脂肪組織、大腸および盲腸の組織を摘出した。大腸の組織切片を HE 染色し、組織における炎症などの病理学的な変化を観察した。また、大腸組織に浸潤した好中球の指標とされるミエロペルオキシダーゼ(MPO)活性を測定した。腸間膜リンパ節(MLN)おける T 細胞群の解析はフローサイトメーターを用いて分析した。

【結果】
8 週間の CNF 摂食においては、対照群と比べてマウスの体重と摂食量に有意な変化はみられなかった。血漿中 TNF-α や糞便中リポカリン濃度、大腸 MPO 活性の炎症性パラメータについても、対照群と比較して有意な増加は認められなかった。大腸の組織学的観察では、大腸の縮小はなく、デキストラン硫酸ナトリウムの投与によって誘導されるような大腸炎の傾向はまったく観察されなかった。また、炎症の指標である肝臓重量の増加も観察されなかった。MLN の T 細胞群の分析をおこなった結果、制御性 T 細胞や Th17 細胞の頻度においても有意な変動はみられなかった。以上の結果から、CNF の経口摂取によって炎症などの組織学的変化は観察されず、免疫学的恒常性も維持されたことから、CNF は経口においても生体適合性を示す素材であることが示唆された。

cellulose nanofiber, dietary fiber, biocompatibility

発表責任者：中山裕介（nakayama.yusuke.32w@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3A03p01
講演日時：3 月 19 日 14:00～ A 校舎 03 会場

Emulsifiers affecting on the thermal properties of rice flour in gluten-free wonton formula

○ Petcharat PRAKAYWATCHARA, Chatchai WATTANAPHAIROJ, Doungjai THIRATHUMTHAVORN (Silpakorn Univ.)

Wonton is a popular food in Asia. Generally, wonton is made from wheat flour containing gluten which causes of Celiac disease. Rice flour is hypoallergenic and can be applied for preparing gluten-free wonton. However, retrogradation has an impact on the qualities of starch-based food and can be reduced by adding emulsifier. The objective of this research was to investigate the effect of emulsifiers on gelatinization and retrogradation properties of rice flour in wonton formula. There are 4 emulsifiers used in this study including glycerol monostearate (GMS), diacetyl tartaric esters of mono- and diglycerides (DATEM), distilled monoglycerides (DMG) and lecithin. Differential scanning calorimeter (DSC8000, Perkin Elmer) was used to determine gelatinization and retrogradation parameters. The result showed that samples containing glycerol (gly) or glycerol combined with emulsifier (gly+em) exhibited higher onset gelatinization temperature than the control significantly ($P<0.05$). Whereas gelatinization enthalpy of all samples had no significant difference ($P\geq0.05$). For the retrogradation properties, it was found that the control sample had a lower onset temperature than others significantly ($P<0.05$). However, peak and end temperatures were not significantly different ($P\geq0.05$). The highest enthalpy of retrograded samples was found in the control and the lowest was found in the sample having 1%DMG. From this study, it could be concluded that the addition of gly or gly+em can reduce retrogradation of rice flour in wonton formula.

gelatinization, retrogradation, rice flour

発表責任者：Doungjai Thirathumthavorn（thdoungjai@yahoo.com）

講演番号：3A03p02
講演日時：3 月 19 日 14:15～ A 校舎 03 会場

澱粉のゲル化に対するオキソ酸の影響
Effect of oxoacids on the starch gelation
○星野 優人、上沢 七海、伊藤 博、小林 厚志（日大工）
○Yuto HOSHINO, Nanami KAMIZAWA, Hiroshi ITO, Atsushi KOBAYASHI (Nihon Univ.)

【緒言】我々はこれまでに各種澱粉のゲル形成に対するナトリウム塩の添加効果について検討したところ、添加するナトリウム塩によってゲル形成に与える影響が異なるという結果を得た。天然澱粉と可溶性澱粉に対してナトリウム塩(水酸化ナトリウム、炭酸ナトリウム、四ホウ酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム)を用いて検証したところ、ゲル形成に対する影響は天然澱粉と可溶性澱粉とでは大きく異なった。さらに炭酸ナトリウムと炭酸水素ナトリウムを用いた場合、トウモロコシ・バレイショ・可溶性澱粉には添加量の増加による変化がみられなかったが、コムギ澱粉にだけゲル形成に必要な澱粉濃度が上昇するということが明らかとなった。以上の結果から、澱粉の状態変化に対して、ホウ酸や炭酸のようなオキソ酸の影響が大きいことが明らかとなった。今回、オキソ酸の影響を詳細に解析する目的で各種リン酸の影響について検討した。
【方法】澱粉には今までと同様に天然澱粉であるトウモロコシ澱粉、コムギ澱粉、バレイショ澱粉と、可溶性澱粉を用いた。ゲルの作製は次の手順で行った。プラスチックチューブに澱粉と純水、ナトリウム塩を加え懸濁状態とした後に、75 °C にて 20 分間振とう加熱を行い糊化状態とした。その後 20 °C に設定したインキュベーターを用いて一晩かけて冷却し、その後に状態観察を行った。ナトリウム塩にはリン酸二水素一ナトリウム、リン酸一水素二ナトリウム、リン酸三ナトリウム水溶液を用いて実験を行い、各ナトリウム塩水溶液を添加した際の澱粉ゲル形成に対する影響を比較した。本実験におけるゾル-ゲルの判断は、反応容器を垂直に保持したのちに、逆さまにした際に垂れてくるようであればゾル、垂れてこなければゲルとして評価した。
【結果】トウモロコシ澱粉におけるナトリウム塩を添加していない場合の臨界ゲル化濃度は 6wt%であった。リン酸三ナトリウムとリン酸一水素二ナトリウムを添加した場合、臨界ゲル化濃度に変化はなく、添加しない場合の臨界ゲル化濃度と同じであった。一方、リン酸二水素一ナトリウムを用いた場合では、添加量を増やすことによりゲル化を抑制する効果がみられた。これらの傾向を踏まえ、pH および塩強度の影響について検討した結果も議論する予定である。

starch, gelation, oxoacids

講演番号：3A03p03
講演日時：3 月 19 日 14:30～ A 校舎 03 会場

# イネ種子の胚乳細胞壁形成に関わる新規分子の機能解析

# Functional analysis of a novel protein involved in cell wall formation in rice seeds.

○緑川 景子[1]、黒田 昌治[2]、石丸 喜朗[1]、阿部 啓子[1,3]、朝倉 富子[1] ([1]東大院農生科・応生化、[2]農研機構・中央農研、[3]神奈川科学技術アカデミー)
○Keiko MIDORIKAWA[1], Masaharu KURODA[2], Yoshiro ISHIMARU[1], Keiko ABE[1,3], Tomiko ASAKURA[1] ([1]Tokyo Univ., [2]NARO, [3]KAST)

【目的】胚乳の細胞壁はコメの割れやすさや吸水性，細胞構造の維持による食感など，品質に大きく関わっている可能性がある．以前，我々は窒素追肥時におけるコメの品質低下について DNA マイクロアレイによる遺伝子の網羅的発現解析を行った．その結果，セルロース合成酵素などを含む，細胞壁合成に関与する酵素をコードする遺伝子が多数抽出された．今回，主に胚乳で細胞壁合成に関与すると想定される新規分子として，BC1L6（Brittle Culm1-Like6）に着目した．BC1L6 のホモログである BC1 は‘鎌いらず遺伝子’として知られており，BC1 を欠損させた株は茎が折れやすく，矮性を示す．また，BC1L6 は C 末端領域に GPI アンカードメインを有する GPI アンカー型タンパク質である．GPI アンカー型タンパク質は，細胞膜中の脂質ラフトにつなぎ止められており，細胞表層に位置することから，BC1L6 は細胞膜に局在する他の細胞壁合成酵素と協働して，胚乳細胞壁の合成制御に関与しているのではないかという仮説を立て，解析を行った．

【方法・結果】BC1L6 の細胞壁合成への関与を調べるため，RNAi 法により BC1L6 を発現抑制したイネ胚盤由来カルスを作製し，プロトプラストを単離した．カルコフロー染色により再形成された細胞壁の蛍光強度を観察したところ，変異株において蛍光が減退することが判明した．さらに BC1L6 ノックアウト株であるレトロトランスポゾン挿入株（Tos ライン）を入手し，細胞壁の構成分子であるβグルカンについて測定を行った．測定は，凍結フィルム法を用いた切片を作製し，カルコフロー染色により行った．その結果，ノックアウト株において蛍光強度の減少がみられた．また，BC1L6 の細胞内局在性を確認するため，RFP 融合 BC1L6 タンパク質をシロイヌナズナ根由来の培養細胞 Deep cell で発現させたところ，BC1L6 も細胞膜に局在することが明らかとなった．また，in situ hybridization 法により，BC1L6 の登熟種子における組織内での発現部位を経時的に解析したところ，登熟期後半の外周部に特に強く発現していることが明らかとなった．種子の登熟は内側から外側に向かってすすむことから，BC1L6 は登熟後期の貯蔵物質蓄積に伴う細胞肥大化のための細胞壁合成に関与している可能性が考えられる．また，BC1L6 のアミノ酸配列から多糖類との結合が予測されるドメイン（CBM：carbohydrate-binding module）を有していることが明らかとなり，細胞壁を構成する多糖類との結合が予測された．以上の結果から BC1L6 は胚乳中の細胞壁合成にあたり，β-グルコシド結合の伸長に関わる分子シャペロンのような働きを担っている可能性が示唆された．

cell wall, rice, endosperm

発表責任者：朝倉富子（asakura@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A03p04
講演日時：3 月 19 日 14:45～ A 校舎 03 会場

人乳由来糖タンパク質に存在する *O*-マンノシル型糖鎖構造
Structure of *O*-mannosyl glycan on Glycoprotein from human milk
○仲村 絵里香[1]、宮竹 瑞貴[1]、深谷 真一[2]、汲原 章民[2]、北口 公司[1]、矢部 富雄[1]([1]岐阜大・応生科、[2]アサヒグループ食品（株））
○Erika NAKAMURA[1], Mizuki MIYATAKE[1], Shinichi FUKAYA[2], Akihito KUMIHARA[2], Kohji KITAGUCHI[1], Tomio YABE[1] ([1]Gifu Univ., [2]Asahi Group Foods, Ltd.)

【目的】
母乳中糖タンパク質の一種である MUC1 ムチンは，HIV-ウイルスの母子間伝播を阻害することが報告されている。この機能は MUC1 ムチンに存在する糖鎖に起因することが知られているが，詳しい糖鎖構造は明らかとされていない。これまでに，糖タンパク質の一種である MUC1 ムチンを免疫原としたモノクローナル抗体を作製し，IgM アイソタイプの 1CF11 抗体を取得した。本抗体は，MUC1 ムチンだけでなく，人乳ラクトフェリンやκ-カゼインといった感染阻害作用をもつ他の人乳中糖タンパク質とも反応性を示した。一方で，ヒトおよび高等霊長類以外の哺乳類の乳とは反応性を示さなかった。本研究では，1CF11 抗体に反応性を示す人乳ラクトフェリン（hLf）を分析試料として用い，この抗体が認識するエピトープ構造を解明することを目的とした。
【方法】
大腸菌発現系を用いて，糖鎖が付加されていない hLf を発現させ，*N*結合型糖鎖を除去した hLf とともに，1CF11 抗体反応性をウエスタンブロットにより解析した。また，3 種類のレクチン（Con A, ABA, PNA）を用いた単糖との競合阻害実験および PAS 染色法を行い，hLf に存在する *N*結合型糖鎖とは別の構造の検出を試みた。さらに，ヒト Caco-2 細胞由来タンパク質の 1CF11 抗体反応性をウエスタンブロットにより確認した。
【結果】
大腸菌発現 hLf には 1CF11 抗体との反応性が観察されなかったことから，1CF11 抗体による hLf の認識には糖鎖構造が必要であることが示唆された。*N*結合型糖鎖除去 hLf に対する抗体反応性の検討により，1CF11 抗体は，*N*結合型糖鎖および *N*結合型糖鎖の関与しない構造を同時に認識していることが示唆された。また，競合阻害実験および PAS 染色法の結果から，hLf に存在する *N*結合型糖鎖とは別の構造を考察したところ，hLf にはマンノースを含む *O*-マンノシル型糖鎖が存在している可能性が示された。さらに，ヒト Caco-2 細胞由来タンパク質の 1CF11 抗体反応性も確認された。これらのタンパク質から *N*結合型糖鎖を除去してもその反応性が残存していたことから，*O*-マンノシル型糖鎖に反応している可能性を検証するため，糖鎖の生成鍵酵素である POMT1/2 の mRNA 発現を RT-PCR により確認したところ，いずれの酵素の発現も確認され，*O*-マンノシル型糖鎖が存在する可能性は高いと考えられた。

*O*-mannosyl glycan, human lactoferrin, 1CF11 antibody

発表責任者：矢部富雄（yabet@gifu-u.ac.jp）

講演番号：3A03p05
講演日時：3 月 19 日 15:00～ A 校舎 03 会場

ガラクトシルグリセロールのヒト表皮角化細胞と神経系細胞への保護効果の検討
Protective effect of galactosylglycerol on human epidermal keratinocytes and neural cells
○田谷 郁実、井上 絢葵、山田 康枝（近大工）
○Ikumi Taya, Ayaki Inoue, Yasue Yamada (Kindai Univ.)

【目的】ストレスは，細胞の DNA，細胞膜上のリン脂質，蛋白を傷害し，生体の構造や機能を乱している．体内の酸化ストレスが増加すると，動脈硬化，心筋梗塞，糖尿病，癌など，さまざまな病気が発症すると考えられている．ストレスに対する保護効果がないかをガラクトシルグリセロール（β-GG）を用いて検討した．糖類の中にはエネルギー源としてだけではなく，抗酸化効果や抗ガン作用など，近年，様々な生理活性を持つものが知られてきている．β-GG はアミラーゼや人工胃液などに溶けにくい難消化性を示し，その他にビフィズス菌の増殖促進，保湿性，乳化物の安定性向上の効果があるが，そのヒトへの生理活性は検討されていない．今後の化粧品や機能性食品への応用の可能性を探るために，正常ヒト表皮角化細胞とヒト神経芽細胞腫株 SK-N-SH を用いて，β-GG の $H_2O_2$ による酸化ストレスに対する効果及び紫外線（UVB）による損傷に対するする保護効果，創傷治癒効果を検討した． UVB は表皮に影響を与え，細胞を損傷して火傷のように赤くなったり（サンバーン），メラニン色素が沈着して褐色になったり（サンタン），シミやソバカスの原因となる．
【方法】$H_2O_2$ による保護効果の検討は，ヒト表皮角化細胞 $0.5\times10^5$ cells/ml に調整し 96well マイクロプレートに播種し，24 時間 37℃5%$CO_2$ インキュベーター内で培養した．培養後，$H_2O_2$ 50 μM を加えた後，最終濃度がβ-GG 10 mM，20 mM，30 mM，50 mM になるように加え 24 時間反応後後，Live and Dead 試薬を加え，蛍光顕微鏡で観察し，生細胞の割合を数えた．また，紫外線による損傷に対する保護効果の検討は，UVB ランプで 1 時間 30 分照射（170 mJ/cm²）後の細胞生存率を MTT assay 法によって測定した．創傷治癒効果を検討するため，コンフルエントに育ったヒト表皮角化細胞と SK-N-SH 細胞にキズを入れて，スクラッチアッセイを行いその回復を測定した．
【結果・考察】β-GG はヒト表皮各細胞の実験で 50 μM $H_2O_2$ による細胞死に対しては 20 mM で有意な保護効果を示した．UVB 照射に対する保護効果の検討でもβ-GG は保護効果が見られた．SK-N-SH による創傷治癒効果の実験では創傷治癒効果が見られた．以上の結果から，β-GG は過酸化水素や紫外線に対する細胞損傷に対して保護効果があり，酸化ストレスへの保護効果があることが示唆された．また，創傷治癒効果が見られることから，細胞増殖効果を持っている可能性も示唆された．

Keratinocyte, Ultraviolet, Oxidative stress

講演番号：3A03p06
講演日時：3 月 19 日 15:25～ A 校舎 03 会場

# Lentzea 属放線菌由来新規 trehalose 類縁体 lentztrehalose 類の構造と生物活性

# The structures and bioactivities of novel trehalose analogues lentztrehaloses isolated from an actinomycete Lentzea sp.

○和田 俊一、澤 竜一、大庭 俊一、波多野 和樹、染野 哲也、久保田 由美子、梅北 まや、林 千草、飯島 希昌子、渋谷 優子、川田 学、五十嵐 雅之（微生物化学研究所）
○SHUN-ICHI WADA, RYUICHI SAWA, SHUN-ICHI OHBA, MASAKI HATANO, TETSUYA SOMENO, YUMIKO KUBOTA, MAYA UMEKITA, CHIGUSA HAYASHI, KIYOKO IIJIMA, YUKO SHIBUYA, MANABU KAWADA, MASAYUKI IGARASHI (Institute of Microbial Chemistry)

Glucose 2 分子が 1,1-結合した特殊な二糖である trehalose は、高い水和性や分子シャペロン機能により、食品添加物、保湿剤、あるいは安定剤として様々な製品に用いられている。また、疾患モデルマウスに対する治療効果の高さから、神経変性疾患や脂肪肝などの治療薬としての開発も期待されている。しかしながら trehalose は、細菌からヒトまで幅広い生物において発現している分解酵素 trehalase により分解されるため、食品や工業製品においては腐敗の原因となり、医薬品としては生物学的利用能の低さが問題となる。また、十分な効果を得るための使用量が多いため、分解産物である glucose による血糖値の上昇から、各種の疾患リスクが上昇することも懸念される。このため、trehalose の特長を保持しつつ trehalase による分解を受けない、新しい類縁体化合物の開発が期待される。

我々は、*Lentzea* 属放線菌 ML457-mF8 株より、新規 trehalose 類縁体 lentztrehalose A, B, および C を発見した。ジメチルアリル基が trehalose の 4 位にエーテル結合した lentztrehalose B をもとに修飾、合成される類縁体群であるものと考えられるが、構造中に trehalose を含む低分子天然化合物の報告例は少なく、特に短側鎖がエーテル結合した化合物は確認できる範囲では他に一例があるのみであり極めて稀である。Lentztrehalose 類は、trehalose と同程度の甘味を示し、また、過去に trehalose において報告されている骨強化作用、抗腫瘍作用、あるいは培養細胞でのオートファジー誘導作用などは、trehalose の 1/4-1/2 の量で同等以上の効果を示しており、trehalose に期待される生物学的活性の特長を保持または増強している。一方で、lentztrehalose 類は各種の生物的分解を受けないことが確認されている。哺乳類由来精製 trehalase や 12 種類の微生物による分解の有無を調べた結果、trehalose が trehalase と 7 種の微生物により分解された一方、lentztrehalose 類は、どの酵素、生物種によってもほとんど分解が見られなかった。マウスにおける吸排実験では、経口投与した trehalose は、定期的に採取した血液、糞、および尿のいずれにおいても検出されず、投与 30 分後には血糖値の上昇が見られ、ほとんどが分解されていたものと思われるが、lentztrehalose 類は投与 30 分後以降、血中で検出され、その後、時間を追って糞、尿から排泄された。この際、血糖値の大きな上昇は見られなかった。これらの結果、trehalose は体内において速やかに分解され glucose となる一方、lentztrehalose 類は分解や修飾を受けにくく、ある程度の量が一定時間は体内を循環しうることが示された。

以上の結果から、lentztrehalose 類は、trehalose と比べて安定な材料物質あるいは医薬品候補化合物として、今後の開発が期待される。

lentztrehalose, trehalose, trehalase

発表責任者：和田俊一（wadas@bikaken.or.jp）

講演番号：3A03p07
講演日時：3 月 19 日 15:40～ A 校舎 03 会場

シングルアンカー型イソマルトメガロ糖におけるケルセチン-3-*O*-β-グルコシド可溶化に寄与する糖質構造の決定
Determination of the structural factor of single anchor-type isomaltomegalosaccharide involved in solubilization of quercetin-3-*O*-β-glucoside
○土生 慎二、ラング ビーラヌッチ、熊谷 裕也、貞廣 樹里、植草 聡太、田上 貴祥、奥山 正幸、原 博、木村 淳夫（北大農）
○ Shinji HABU, Weeranuch LANG, Yuya KUMAGAI, Juri SADAHIRO, Sota UEKUSA, Takayoshi TAGAMI, Masayuki OKUYAMA, Hiroshi HARA, Atsuo KIMURA (Hokkaido Univ.)

【研究背景】 ケルセチン-3-*O*-β-グルコシド（Q3G、フラボノイド）は抗動脈硬化や抗糖尿病などの良好な作用を示すが、水溶解量は低く生体内への取り込みが少ない。従って溶解量を高めることは Q3G の機能向上につながる。シングルアンカー型イソマルトメガロ糖（S-IMS）は 10～100 残基の糖質であり、α-(1→6)-グルコース糖鎖の還元末端にα-(1→4)-グルコシド糖鎖を有する。特に「α-(1→6)残基数が 10 か 11 でα-(1→4) 残基数が 4～6」の S-IMS は Q3G 可溶化能を持ち、ラット小腸内で Q3G 吸収促進を行う S-IMS も存在する。しかし本効果に寄与する S-IMS の構造が解明されていない。本研究では S-IMS の部分的な糖質構造を作製し、Q3G の可溶化能に関与する構造を解析した。
【方法・結果】 S-IMS の部分構造に注目し以下の 3 糖質を用いた：α-(1→6)-グルコシド糖質（IGn: n=3-22)、α-(1→4)-グルコシド糖質（MGm: m=1-13）およびα-(1→6)-グルコシドとα-(1→4)-グルコシドの両結合を有する糖質（IGn-MGm）（n と m は結合数)。IGn-MGm は $IG_1$-MGm（m=1,5,6)、$IG_9$-$MG_2$ と $IG_{10}$-$MG_5$ を用いた（$IG_9$-$MG_2$ と $IG_{10}$-$MG_5$ は S-IMS に属す)。$IG_1$-MGm は *Aspergillus niger* 由来α-glucosidase を MGm に作用させ、糖転移反応により $IG_1$ を MGm に構築することで作製した。$IG_9$-$MG_2$ はα-amylase で $IG_9$-$MG_5$ の MGm を消化し調製した。糖質による Q3G 水可溶化能は、20 mM の糖試料を 10 mM Q3G と混合し、遠心分離後の上清に含まれる可溶化 Q3G を HPLC-UV 法で定量し評価した。
Q3G 可溶化能は、用いた糖質における IGn や MGm 構造の重合度が大きいほど上昇した。同じ重合度を有する糖質における比較を行った。重合度 5 以下の MGm および IGn が示す Q3G 可溶化能はほぼ同じであったが、重合度 6 以上では MGm が IGn より Q3G 可溶化能を高めることが観察された。$MG_{13}$ の構造を持つ糖質は $IG_{10}$-$MG_5$ より 1.6 倍高い Q3G 可溶化能を示した。S-IMS における MGm 構造の Q3G 可溶化能の影響を調べるため、$IG_{10}$-$MG_5$、$IG_9$-$MG_2$ と $IG_9$ を比較した。MGm 構造の m が 0 や 2 になると、$IG_{10}$-$MG_5$ のそれぞれ 0.29 および 0.33 倍に低下した。S-IMS の Q3G 可溶化能は MGm 構造の鎖長に依存すると考えられた。次に S-IMS における IGn 構造の Q3G 可溶化能の影響を調べるため、$IG_{10}$-$MG_5$ と $IG_1$-$MG_6$ を比較した。IGn 構造の n が 10 から 1 になると 0.71 倍に低下した。S-IMS の IGn 構造の鎖長も Q3G 可溶化能に影響すると考えられた。以上の結果から、IGn-MGm 構造を持つ糖質において $MG_5$ 以上が Q3G 可溶化能を示した。α-(1→4)-グルコシド結合が約 6 個で 1 らせんを形成するので、Q3G 可溶化に本らせん構造が関わる可能性がある。しかし $IG_{10}$-$MG_5$ の MGm は 6 以下であることから、IGn 構造の寄与（分子表面での相互作用）も考えられた。

isomaltomegalosaccharide, quercetin-3-*O*-β-glucoside, solubilization

発表責任者：木村淳夫（kimura@abs.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：3A03p08
講演日時：3 月 19 日 15:55～ A 校舎 03 会場

# 市販納豆および豆類に含まれるα-ガラクトオリゴ糖類の定量分析

# Quantitative analysis of galacto-oligosaccharides included in commercial natto products and beans

○石川 千秋、森光 康次郎（お茶大院ライフ）
○Chiaki ISHIKAWA, Yasujiro MORIMITSU (Ocha Univ.)

【目的】マンニノトリオース（Mnt）は、大豆発酵食品に含まれているα-1,6 ガラクトシル結合を持つ三糖であり、腸内細菌叢改善作用を持つ。これまで、市販大豆発酵食品中の Mnt 含量の比較や味噌中の含量の変化について報告してきた。しかし、大豆使用量や発酵に用いられる微生物の差異が及ぼす影響についての検討はいまだ十分になされていない。

そこで本研究では、市販納豆ごとに含まれる Mnt およびガラクトオリゴ糖類（スタキオース、ラフィノース、メリビオース）の定量分析を実施し、菌種の違いや原料大豆の違いが納豆中オリゴ糖含量に及ぼす影響について調べた。

さらに、原料である大豆や大豆以外の雑豆類について、Mnt 含量および種々のガラクトオリゴ糖類量を測定し、大豆との比較および Mnt 給源としての可能性を検討した。

【方法】市販納豆サンプルは-20℃の冷凍庫に移し、発酵を停止させ、凍結乾燥した後にミルサーで粉砕し、乾燥粉末試料とした。試料 1g を熱水抽出し、遠心分離にて得られた上清を凍結乾燥し、水溶性画分を得た。上清の凍結乾燥物を MQ 水で定容した後に遠心限外ろ過し、HPLC 分析に供した。

4 品種の大豆および大豆以外の雑豆類 9 種（アズキ、ササゲ、レンズマメ、ヒヨコマメなど）や未熟状態で食べる豆類の Mnt 含量についても市販乾物または自家栽培品を用い、同様に測定した。

【結果と考察】市販納豆製品においては、先行研究と同様に Mnt の含有が確認できた。また、四糖類のスタキオースについても残存が確認された。市販納豆の製品間には 1.5~2 倍程度 Mnt 含有量に差があることが示された。

また、大豆およびその他の雑豆類において最も多く含まれているガラクトオリゴ糖類はスタキオースであり、ついで三糖類のラフィノースが多かった。大豆の品種によってはササゲ、アズキのほうがスタキオース含量は多かった。調理・加工・発酵などの過程を経る前の豆の状態においては、Mnt の含有はほとんど確認されなかった。

これらのことから、Mnt 含量の多い大豆発酵食品を生産するうえでは、原料大豆の選定が重要であることが示唆された。さらに、ガラクトオリゴ糖の給源としての雑豆類の利用が有用であることが示された。今後は原料大豆を統一し、異なる菌を用いて発酵させることで発酵関連微生物と Mnt 含量との関係について検討する予定である。

manninotriose, galacto-oligosaccharide, soybean fermented food

講演番号：3A03p09
講演日時：3 月 19 日 16:10～ A 校舎 03 会場

エゴマ由来機能性オリゴ糖の分析
Analysis of functional oligosaccharides from *Perilla frutescens* var. frutescens (Egoma)
○竹内 萌恵[1]、加島 隆洋[2]、鈴木 寿[2]、北口 公司[1]、矢部 富雄[1] ([1]岐阜大・応生科、[2]岐阜県産業技術センター)
○Moe TAKEUCHI[1], Takahiro KASHIMA[2], Hisashi SUZUKI[2], Kohji KITAGUCHI[1], Tomio YABE[1] ([1]Gifu Univ., [2]Industrial Technology Center, Gifu prefectural Govenment)

【目的】
エゴマ（*Perilla frutescens* var. frutescens）はシソ科・シソ属の一年生草本であり，種子から抽出した油が古くから利用されてきた油糧作物の一種である。その油はα-リノレン酸を多く含み，動脈硬化抑制などの生理機能が期待されることから，近年健康維持増進に対する効果で注目され，料理油としての利用が高まっている。一方で，搾油後の残渣の多くは廃棄されている問題がある。エゴマ搾油残渣には，タンパク質や食物繊維が豊富に含まれるために，食用素材としての利用も大いに期待される。しかし，エゴマ残渣中の機能性成分に関する知見はこれまでほとんどなかった。そこで本研究では，エゴマ搾油残渣中の機能性成分としてオリゴ糖の探索・同定をすることを目的とした。
【方法】
エゴマ搾油残渣を用いて熱メタノール抽出をし，濾液に対して等量のヘキサンで 3 回脱脂をした。下層を集め，濃縮・凍結乾燥をして得たものをエゴマ由来粗糖とした。エゴマ由来粗糖をゲル濾過カラムを用いた HPLC によって分析し，オリゴ糖の種類を推定した。また，エゴマ由来粗糖を活性炭カラムクロマトグラフィーにて分画後，フェノール硫酸法によって糖の溶出を確認し，得られた画分を Fra. 1 - 6 と定義した。このうち，糖の溶出が確認された Fra. 3 - 5 に対し，アミノカラムを用いた HPLC による糖組成分析を行った。続いて各フラクションに対してインベルターゼ等の各種酵素処理や酸加水分解を行うことで糖の同定を試みた。
【結果】
ゲル濾過カラムを用いた HPLC により，抽出で得られたエゴマ由来粗糖からは，二糖類，三糖類，四糖類の存在が確認された。また，活性炭カラムクロマトグラフィーで分画した 2%プロパノール溶出画分である Fra. 3 には二糖類，4%プロパノール溶出画分である Fra. 4 には三糖類，6%プロパノール溶出画分である Fra. 5 には三糖類および四糖類が含まれていることが，アミノカラムを用いた HPLC により示唆された。さらに，Fra. 3 - 5 に対して各種酵素処理および酸加水分解を行ったところ，Fra. 3 には主に二糖類スクロースが，Fra. 4 には三糖類プランテオース及びおよび二糖類メリビウロースが含まれていた。また，Fra. 5 には難消化性オリゴ糖である三糖類ラフィノース及び還元末端フルクトースをもたない四糖類の存在が認められた。本研究結果は，エゴマ搾油残渣が機能性オリゴ糖の生産原料になりうることを示唆しており，エゴマ搾油残渣再利用の可能性を示している。

*Perilla frutescens* var. frutescens, planteose, oligosaccharides

発表責任者：矢部富雄（yabet@gifu-u.ac.jp）

講演番号：3A03p10
講演日時：3 月 19 日 16:25～ A 校舎 03 会場

# 米粉パンの発酵および糖消長について

# The Fermentation Properties of Rice Flour Mixed Bread and its Change in Sugar Content

土川 瀬里奈[2]、○奥西 智哉[1]、翠川 美穂[2]、林 徹[2]、堀 清純[3]、岡留 博司[1]、五月女 格[1]、安藤 泰雅[1] ([1]農研機構食品研、[2]聖徳大学、[3]農研機構次世代開発セ)
Serina TSUCHIKAWA[2], ○ Tomoya OKUNISHI[1], Miho MIDORIKAWA[2], Tohru HAYASHI[2], Kiyosumi HORI[3], Hiroshi OKADOME[1], Itaru SOTOME[1], Yasumasa ANDO[1] ([1]NFRI, [2]Seitoku Univ., [3]NICS)

【目的】
パン発酵中ではα-およびβ-アミラーゼにより小麦粉澱粉が分解され生成したマルトースが後期発酵に利用される。近年、米粉がパン材料として使用され始めている。小麦粉/米粉混合材料の場合、発酵過程のマルトースは米由来グルコシダーゼによってグルコースに分解されやすくなり、異なる発酵様式になることが予想される。小麦粉/米粉ミックスパン製造時の発酵あるいは糖消長について検討を行なったので報告する。

【実験方法】
小麦粉（日清製粉、カメリア)、米粉（日ノ本穀粉、ソワリス）およびその他製パン材料は市販品を用い、ホームベーカリにより製パンを行った。焼成パンのクラムの水抽出物をイオンクロマトグラフにて分析を行い、グルコース、フルクトース、スクロースおよびマルトース含量を求めた。ファーモグラフにて各種パン生地を 30℃でインキュベートし、5 分間ごとに捕集された発酵ガス量を記録した。α-およびβ-アミラーゼ活性測定はメガザイム社キットをそれぞれ用いた。グルコシダーゼ活性測定は既報（岩田ら、2005）に従った。SDS バッファーによる抽出物を SDS-PAGE 分析し、各種粉中のタンパク質プロファイルを得た。

【実験結果】 小麦粉の 20%を米粉に置換した時、無糖生地の発酵動態は初期発酵が増大した。米α-グルコシダーゼによりマルトースがグルコースに分解されるという高野ら（1980）の推察と一致する。また、焼成パンにおいても米粉置換によりパン中のグルコースは増加し、マルトースは減少が観察された。米粉を 1M NaCl 洗浄したもの（洗浄米粉）ではこれらの現象は見られず、米粉を 135℃-1 時間焼成したもの（焼成米粉）でも同様であった。洗浄および焼成処理により米粉中α-グルコシダーゼが除去あるいは失活したことが原因と考えられたが、小麦粉へのα-グルコシダーゼ添加試験では発酵様式およびパン中糖分布には変化がなかった。洗浄および焼成米粉のα-アミラーゼ活性は減少していた。一方、洗浄および焼成米粉それぞれ単独ではβ-アミラーゼ活性には変化がなかったが、小麦粉とのミックス粉では活性増加が見られた。SDS-PAGE タンパク質プロファイルでは洗浄米粉は 20kDa 付近のバンドが減少している。既報（Ohtsubo and Richardson, 1992）ではα-アミラーゼインヒビターであることから、インヒビター消長の米粉パン中の糖消長への関与が示唆された。本研究は、農林水産省「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業（28014B)」の支援を受けて実施した。

rice flour bread, sugar, enzyme

発表責任者：奥西智哉（tomoyaok@affrc.go.jp）

講演番号：3A03p11
講演日時：3 月 19 日 16:50～ A 校舎 03 会場

麹甘酒の含有糖成分の同定
Determination of sugar component in koji-amazake
○小黒 芳史[1]、西脇 俊和[2]、小林 和也[2]、信田 亮太[1]、倉橋 敦[1]([1]八海醸造・研究開発、[2]新潟農総研・食研セ)
○ Yoshifumi OGURO[1], Toshikazu NISHIWAKI[2], Kazuya KOBAYASHI[2], Ryota SHINADA[1], Atsushi KURAHASHI[1] ([1]R&D center, Hakkaisan Brewery Co., Ltd., [2]Food Res. center, Niigata Agricultural Res. Inst.)

【序論】我が国の伝統的米発酵飲料である麹甘酒は、その類似性から「飲む点滴」と言われている。しかし、その含有成分に関する研究報告は意外に少ない。麹甘酒の機能性を検討する上で含有成分の把握や基盤的知見の蓄積は重要であるので、我々はメタボローム解析を主体として甘酒に含まれる成分の網羅的同定に取り組んでいる[1)]。本大会では麹甘酒の含有成分のうち甘味の主体である糖成分の同定および定量解析を行ったので報告する。
【方法】麹甘酒は、精米歩合 60%の白米から製麹した麹と水のみを用いて調製した。分析には麹甘酒の遠心上清を適度に希釈し試料として用い、超高速液体クロマトグラフ-質量分析（UPLC-MS, Waters 社)により糖分析を行った。麹甘酒より得られたピークは標準物質との比較解析により成分の同定を行った。
【結果】UPLC-MS による分析の結果、麹甘酒中に含まれる単糖はグルコースのみが検出された。二糖類では、グルコースに次ぐ含有量であったマルトースをはじめ、トレハロース、イソマルトース、ゲンチオビオース、ニゲロース（サケビオース)、コージビオース、ソホロースが検出された。これまでの報告[2)]ではソホロースを検出した例はなく、本報告が初めてである。ソホロースは、グルコース 2 分子が β1-2 結合した二糖で β グルコシダーゼによる転化又はキャラメル化によって生成することが知られている。よって、製麹・糖化中における転化、もしくは甘酒の加熱の際に生じた可能性がある。三糖類は、パノース、イソマルトトリオースの他に 3 種類の未知三糖を検出した。四糖から六糖については検出されなかった。これまでの報告では四糖以上の糖が検出されている例があるが[2)]、これは麹の質や糖化条件の違いによると考えられる。以上のように単糖から三糖までの検出された 12 ピークの内 9 ピークの糖類を同定しており、残りの 3 ピークにおいてはその構造を現在同定中である。本解析により、麹甘酒の含有糖情報が追加され、麹甘酒の栄養機能性解析を進める上で重要な知見となったと考えている。

1）倉橋ら，第 68 回日本生物工学会大会，1P-1p089（2016）
2）四方ら，甘酒の成分について（第一報）糖の定量，日本醤油研究所雑誌，3，105-110（1977）

amazake, koji, sugar

発表責任者：小黒芳史（y.oguro@hakkaisan.jp）

講演番号：3A03p12
講演日時：3 月 19 日 17:05～ A 校舎 03 会場

# 海藻製品中の単糖の迅速分析

# Rapid analysis for monosaccharides in seaweed products

○垣田 浩孝[1,2]、小比賀 秀樹[2] ([1]日大文理、[2]産総研健康工学)
○Hirotaka Kakita[1,2], Hideki Obika[2] ([1]Nihon Univ., [2]AIST)

【緒言】植物製品中の有用成分の過大広告が社会問題となっている。また国民も健康に強い関心を持っている。現在、製品なかでも食品の有用成分に関する正確な情報提供を求める声が消費者側から高まっている。植物製品中の有用成分といっても多種多様に分かれる。例えば、海藻製品中の糖質を例に挙げてみても単糖、オリゴ糖、多糖とさまざまな成分があげられる。多くの食用海藻の糖質含有量は 40%以上で、海藻は多くの糖質を含む。緑藻由来製品にはグルコース、フルクトース、シュークロース、でんぷんが含まれる。紅藻由来製品にも緑藻同様の糖が含まれるがその含有量は低く、紅藻に特有の低分子糖の存在が特徴的である。褐藻はマンニトールという糖アルコールを含んでいることが特徴である。つまり海藻製品に含まれる糖は原料の海藻に依存している。一方、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は従来から糖分析に用いられてきた有用な手法である。そこで本研究では HPLC を用いた海藻製品中の単糖の迅速分析を開発することを目的とした。
【方法】海藻製品は蒸留水で洗浄後に凍結し、次いで凍結乾燥により水分を除去した凍結乾燥品を調製した。凍結乾燥品に抽出液を加えて粉砕し、遠心分離で不溶解物と分離し粗抽出液を得た。得られた粗抽出液を糖質分離用カラムに添加し糖分析を行った。TSKgel $NH_2$-100 及び TSKgel Amide-80 を糖質分離用カラムとして用いた。粒径は 3μm と 5μm を比較した。分析カラム長 25 cm と 15cm で糖の溶出挙動を比較した。アセトニトリルと水の混合液を移動相として用いた。オートサンプラー AS-8020、デガサーSD-8022、送液ポンプ CCPS、オーブン CO-8020、示差屈折計 RI-8020 を組み合わせたクロマトグラフ装置を用いた。
【結果】各種海藻製品により単糖組成及び含有量が異なっていた。同じ海藻由来の製品であっても海藻産地により糖組成に違いがみられた。
【考察】各種海藻製品中の糖を迅速に分析することが可能であったことから、市販海藻製品の糖分析手法として応用が可能であると判断した。

HPLC, monosaccharide, alga

講演番号：3A03p13
講演日時：3 月 19 日 17:20～ A 校舎 03 会場

# ピロロチアゾール系メイラード色素の生物活性と食品中の分布

# Functions and distribution of a pyrrolothiazole pigment formed by the Maillard reaction

○野田 響子[1]、寺沢 なお子[2]、島村 裕子[3]、村田 容常[1]([1]お茶大、[2]金沢大、[3]静岡県大)
○ Kyoko NODA[1], Naoko TERASAWA[2], Yuko SHIMAMURA[3], Masatsune MURATA[1] ([1]Ochanomizu Univ., [2]Kanazawa Univ., [3]Univ. Shizuoka)

【目的】 我々は、システインとグルコース間のメイラード反応により生成する新規色素化合物として、(*3R, 7aS*)-2,3,7,7a-テトラヒドロ-6-ヒドロキシ-5,7a-ジメチル-7-オキソ-ピロロ[2,1-*b*]チアゾール-3-カルボン酸（ピロロチアゾレート）を同定した[1)]。これまで、システインを用いたモデル系によりその生成条件を明らかにするとともに、生成経路を考察している[2)]。ここでは、ピロロチアゾレートの抗菌活性、抗酸化性、変異原性などの生物活性を測定し、また、食品中での分布を調べた。
【方法】 ピロロチアゾレート標品は、0.1 M L-システイン、0.03 M L-リジン、0.5 M D-グルコースを 0.5 M 酢酸緩衝液（pH 5.0、1.2 L）に溶解して 120℃で 3 時間加熱した反応液から、溶媒抽出法、シリカゲルクロマトグラフィー、逆相系 HPLC により調製した。抗酸化性として、DPPH ラジカル消去活性測定、SOD 様活性測定、ロダン鉄法によるリノール酸酸化測定を行った。抗菌活性試験はペーパーディスク法で、ピロロチアゾレートの最大濃度 1.6 mg/mL で行った。また、Ames 試験により変異原性を検討した。食品中のピロロチアゾレートの定量にはダイオードアレイ検出器（DAD）付きの HPLC（カラム：ODS、溶離液：0.1% HCOOH、測定波長：220-500 nm）を用いた。液体の食品においては、酢酸エチルで洗浄後、水層を pH 2 以下に調整し、ピロロチアゾレートを酢酸エチルで抽出した。減圧下濃縮乾固後、MeOH で定容して定量分析を行った。固形の食品においては、MeOH で抽出後、MeOH を減圧下除去した。その後、液体の食品と同様の操作を行なった後、定量分析した。
【結果】 ピロロチアゾレートは、DPPH ラジカル消去活性を示したが、SOD 様活性は示さなかった。また、リノール酸の酸化を抑制したことから、抗酸化活性を持つことが示された。ピロロチアゾレートの抗菌活性をペーパーディスク法で調べたところ、天然培地、合成培地のいずれも、最大濃度 1.6 mg/mL においても阻止円は確認されなかった。また、Ames 試験より、5 mg/プレートにおいても変異原性は認められなかった。醤油やビール、味噌抽出物の酸性画分を DAD-HPLC で分析したところ、ピロロチアゾレートの存在が確認された。醤油中のピロロチアゾレート量は 5-100 μg/100mL 程度であり、色の濃いものほど多く見られた。味噌では 5-30 μg/100 g、ビールでは 10-30 μg/100 mL のピロロチアゾレートが見られた。現在、他の食品についても検討している。

(1) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **79**, 1350-1355 (2015)
(2) *Food and Funct.*, **7**, 2551-2556 (2016)

Maillard reaction, cysteine, soy sauce

講演番号：3A03p14
講演日時：3 月 19 日 17:35～ A 校舎 03 会場

# ペントース系メイラード反応の褐変における 4 - ヒドロキシ-5-メチル-3(*2H*) - フラノン（HMFO）の役割

# The role of 4-hydroxy-5-methyl-3(*2H*)-furanone (HMFO) in the browning of pentose-based Maillard reaction

○中村 美月、村田 容常（お茶大）
○Miki NAKAMURA, Masatsune MURATA (Ochanomizu Univ.)

【目的】

メイラード反応は食品の加工・調理、貯蔵中に起こる非酵素的褐変反応である。本研究室では、ペントース系メイラード反応とヘキソース系メイラード反応を比較し、その違いを明らかにしてきたが[1)]、その過程でペントース系メイラード反応において UV 吸収 280 nm に極大吸収を示す主要中間物質を見出した。その成分を単離し、4-ヒドロキシ-5-メチル-3(*2H*)-フラノン（HMFO）と同定した。HMFO は単離操作中に重合褐変が認められ、その褐変にはジカルボニル化合物の関与が示唆された[2)]。そこで本研究では、ペントース系メイラード反応としてキシロースとリジンを用い、その加熱溶液における HMFO とジカルボニル化合物の消長を調べた。

【方法】

13.3 mM キシロース、27.4 mM リジン及び 27.6 mM *o*-フェニレンジアミン（OPD）を pH 8.0 のリン酸緩衝液に溶解し 100℃で 0, 0.5, 1, 3, 6 時間加熱した。また、同条件のキシロース・リジン溶液を加熱した後、OPD を加え室温で 5 時間反応させた。次に、1.8 mM HMFO、1.8 mM OPD を pH 8.0 のリン酸緩衝液に溶解し、100℃で 0, 0.5, 1, 3, 6 時間加熱した。また HMFO 溶液を加熱後、OPD を加え室温で 5 時間反応させた。それぞれのサンプルを DAD-HPLC 及び LC-MS で分析し、HMFO とキノキサリンを定量した。メチルグリオキサールキノキサリンを調製し、各種キノキサリン定量のための標品とした。

【結果】

キシロース、リジン、OPD の混合溶液を加熱し、DAD-HPLC で分析すると 280 nm に極大吸収を示す HMFO と 240 nm 及び 320 nm に極大吸収を示すキノキサリンと思われた 7 つのピークが検出された。LC-MS 分析の結果、主要生成物は 1-デオキシキシロソン（1-DX）キノキサリンであった。キシロースーリジンの加熱溶液に OPD を反応させると 1-DX キノキサリンはほとんど検出されず、HMFO が検出されその後減少した。また HMFO 溶液の加熱では主にジアセチルやメチルグリオキサールが検出され、その後減少した。これら結果より、キシロースーリジン系では 1-DX を経由して HMFO が形成され、HMFO はジアセチルやメチルグリオキサールに分解し、褐変していくと考えられた。

1) *Food Sci. Technol. Res.*, **21**, 813-819 (2015) , 2) *ibid*, in press.

Maillard reaction, furanone, dicarbonyl

講演番号：3A03p15
講演日時：3 月 19 日 17:50～ A 校舎 03 会場

D-Xylose-Glycine 系メイラード反応における新奇赤色色素化合物の同定
Identification of a Novel Red Pigment Formed in a D-Xylose-Glycine Reaction System
○川端 真由、泉 雄斗、渡辺 寛人、早瀬 文孝 (明治大農)
○MAYU KAWABATA, YUTO IZUMI, HIROHITO WATANABE, FUMITAKA HAYASE (Meiji Univ.)

【目的】食品中にはタンパク質や糖質といった様々な成分が共存しており、食品の加工、貯蔵、調理の際にこれらの成分間反応が起こる。その一つとして知られるメイラード反応は最終生成物として褐色の難分解性含窒素高分子化合物メラノイジンを生じる。しかし、メラノイジンの構造や生成経路については不明な点が多い。当研究室ではこれらの解明を目的として D-Xylose-Glycine 系モデルメイラード反応において、Blue-M1[1]をはじめとする青色色素に加え、複数種の赤色色素や黄色色素を同定してきた。これらの色素化合物は褐変に伴い減少していくため、メラノイジン生成の中間体として重要であると考えられている。本研究では、D-Xylose-Glycine 系モデルメイラード反応の新奇赤色色素化合物を単離し、構造解析を行った。
【方法】D-Xylose(1 M)と Glycine(0.1 M)を炭酸水素ナトリウム(0.1 M)含有 60%エタノール溶液(pH 8.1)中で 37℃にて 48 時間インキュベートした。この反応溶液を各種クロマトグラフィーにより精製し、新奇赤色色素について逆相 HPLC、LC-ESI-Q-TOF-MS、NMR による構造解析を行った。
【結果】陰イオン交換クロマトグラフィーにて反応溶液から赤色色素画分を分画し、固相抽出にて精製後、逆相 HPLC により新奇赤色色素を単離・精製した。UV-Vis スペクトル測定の結果、560 nm に吸収極大を持ち、これは D-Xylose-Glycine 系メイラード反応における主要な赤色色素 Red-M1 のものと類似した。Red-M1 はピロロピロール構造とピロール構造を有し、アマドリ化合物が架橋して形成されたアゼピン構造を含む化合物である。さらに、LC-ESI-Q-TOF-MS による質量解析と組成演算の結果と NMR 解析の結果から、新奇赤色色素は分子量 547、組成式 C24H27N4O11 と決定し、Red-M1 からアマドリ化合物の側鎖 C4H8O4 が脱離した構造であった。

[1] 渡辺寛人、早瀬文孝、化学と生物 Vol. 50, No. 2, 80-82, 2012

Maillard Reaction, Pigments, Pyrrolopyrrole

発表責任者：川端真由（may.121340@gmail.com）

講演番号：3A03p16
講演日時：3 月 19 日 18:05～ A 校舎 03 会場

# アマドリ転位化合物が及ぼす D-キシロース系メイラード反応への影響

Effects of Amadori Rearrangement Products to D-Xylose Model Maillard Reaction.

○泉 雄斗、川端 真由、横関 俊昭、渡辺 寛人、早瀬 文孝 (明治大農)
○Yuto IZUMI, Mayu KAWABATA, Toshiaki YOKOZEKI, Hirohito WATANABE, Fumitaka HAYASE (Meiji Univ.)

【目的】食品成分間反応の一つとして知られるメイラード反応は、カルボニル化合物とアミノ化合物間の非酵素的褐変反応であり、食品の品質形成や劣化に関する重要な反応である。その最終生成物の褐色色素メラノイジンは難分解性の高分子化合物であり、構造や生成経路について未だ不明な点が多い。当研究室では D-キシロース―グリシンモデル系において、主要生成物である Blue-M1[1]を始めとするピロロピロール構造を有する化合物を同定してきた。これらの化合物は単独で褐色化することから、褐変における重要な中間体であると考えられる。しかし、メイラード反応において中間体化合物であるとされるアマドリ転位化合物やそれが環化した化合物がピロロピロール化合物の生成にどのように関わっているのかは不明な点が多い。そこで本研究では、モデル系メイラード反応溶液にを添加し、生成物を解析することでピロロピロール構造の生成経路の解明を目指した。
【方法】D-キシロース(1 M)と、β-アラニンおよびグリシン(0.1 M)を炭酸水素ナトリウム(0.1 M)含有 60%エタノール溶液に溶解させてモデル反応溶液を調製した。この溶液にキシロースとグリシンから合成したアマドリ転位化合物 (ARP) および ARP の環化によって生成すると考えられる 3-ピロリドン構造を有した化合物 *N*-*tert*-butoxycarbonyl-3-pyrrolidone (Boc-Pyr) を添加して窒素置換後 26.5℃にてインキュベートした。この反応溶液を陰イオンクロマトグラフィー、固相抽出にて精製し、逆相 HPLC、LC-ESI-Q-TOF-MS による解析を行った。
【結果】キシロース―グリシン系 ARP をキシロース―β-アラニン系反応溶液に添加した反応溶液を逆相HPLC分析に供したところ、添加していないものでは検出されなかったピークが複数検出された。これらのピークを LC-ESI-Q-TOF-MS 分析によって解析したところ、ピロロピロール化合物に ARP が取り込まれたことより、ピロロピロール構造の形成における ARP の重要性が示唆された。
また、Boc-Pyr を添加したキシロース―グリシン系反応溶液を LC-ESI-Q-TOF-MS によって分析したところ、当研究室で推定されていたピロロピロール化合物前駆体の類縁体であったことから、ピロロピロール構造の形成には 3-ピロリドンを介した前駆体の生成が重要であると示唆された。
これらの結果から、ピロロピロール構造の形成はアマドリ転位化合物および 3-ピロリドン化合物を介した縮合によって起こると考えられる。

[1] F. Hayase, et al, Biosci.Biotechnol.Biochem, 63, 1512-1514 (1999)

Maillard Reaction, Pigments, Amadori Rearrangement Products

講演番号：3A04a01
講演日時：3 月 19 日 09:20～ A 校舎 04 会場

# カラムスイッチングを用いたキラルアミノ酸分析システムの検討

# Investigation of chiral amino acids analysis using column switching system

○渡辺 淳[1]、宇野 由紀[1]、箕畑 俊和[1]、寺田 英敏[1]、飯田 順子[1]、中野 洋介[2]、福崎 英一郎[2]([1]島津製作所、[2]大阪大院工)
○Jun WATANABE[1], Yuki UNO[1], Toshikazu MINOHATA[1], Hidetoshi TERADA[1], Junko IIDA[1], Yosuke NAKANO[2], Eiichiro FUKUSAKI[2] ([1]Shimadzu Corp., [2]Osaka Univ.)

## 1. Introduction

タンパク質を構成する 20 種のアミノ酸は、グリシンを除いて L/D の光学異性体が存在する。L-アミノ酸がタンパク質の構成要素や栄養源として体内に多量に存在することと比較して、D-アミノ酸の含量は極めて低いが、発酵食品の成分分析、脳神経系における生理機能解析やバイオマーカー探索、さらには健康や美容など様々な分野で注目されている。但し、その分析は多種多様なペプチドやアミノ化合物の妨害を受けることが多く、正確な含量解析には高感度で高選択的な分析法が求められる。今回、キラルカラムを用いた高速、高分離、高感度なキラルアミノ酸分析システムを構築し、発酵食品中の L/D 体存在比を確認した。

## 2. Method

キラルカラムは CROWNPAK CR-I(+)/CR-I(-)(3mm x 150mm, 5μm, DAICEL corp.)を用い、カラムスイッチィングにより CR-I(+)と CR-I(-)を自動的に切替可能なシステムを構築した。HPLC は Isocratic モードで移動相はアセトニトリル/エタノール/水/TFA = 80/15/5/0.5、流速は 0.6mL/min、カラムオーブン温度は 20℃で分析時間は 10 分である。検出は液体クロマトグラフ質量分析計 LCMS-8050(島津製作所)を用いた。

アミノ酸標準品混合溶液により保持時間及び再現性を確認後、水・メタノール・クロロホルムによる液-液抽出により処理された発酵食品サンプルを分析し、面積比から L/D 体存在比を確認した。

## 3. Results

標準品混合液を用いた検討では、CR-I(+)/(-)で得られた面積比を比較したところ、良好な再現性が得られた。Gln と Lys、Ile と *allo*-Ile、Thr と *allo*-Thr は、物理化学的性質が極めて類似しており、本クロマト条件では共溶出する場合がある。トリプル四重極型質量分析装置ではほぼ同一の MRM トランジッションのため、CR-I(+)では同一保持時間で共溶出すると分離できない可能性があるが、CR-I(-)に切り替えることで分離確認することかできた。

黒酢を含む飲料 3 種類とヨーグルト飲料 2 種類について L/D 体存在比を確認したところ、Ala、Arg、Asn、Glu、Lys、Ser で D 体が比較的多く含まれている事を確認した。特にヨーグルト飲料では D-Ala と D-Glu が L 体より多く存在するものがあることを確認した。

（参考文献） Y Nakano et al, J Biosci Bioeng. 2016 Aug 16. pii: S1389-1723(16)30177-3.

chiral amino acids, LC/MS/MS, column switching

講演番号：3A04a02
講演日時：3 月 19 日 09:35～ A 校舎 04 会場

# 食品中の D-アミノ酸分析に資する LC-MS/MS 法の開発

# Development of LC-MS/MS method for D-amino acid analysis in foods

○中野 洋介、紺屋 豊、谷口 百優、福崎 英一郎（阪大工）
○Yosuke NAKANO, Yutaka KONYA, Moyu TANIGUCHI, Eiichiro FUKUSAKI (Osaka Univ.)

D-アミノ酸は L-アミノ酸とは異なる生物学的機能を担うため，近年様々な分野で大きな注目を集めている．食品研究においては，D-アミノ酸と L-アミノ酸で呈味が異なることに着目し，D-アミノ酸を新たな呈味物質として利用する試みが行われ始めている．D-アミノ酸と L-アミノ酸を分離し，分析する方法は数多く報告されているが，それぞれが非常に近い物理化学的性質をもつため，ほとんどの鏡像体選択的アミノ酸分析手法では，アミノ酸の誘導体化といった特殊な処理を行うことで，望ましい分離あるいは感度を得ている．しかしながら，実際にはそれらの手法がもつ特有の煩雑性やスループットの点で改善すべき問題が多い．そこで本研究では，液体クロマトグラフータンデム質量分析計（LC-MS/MS）を用いて，誘導体化を行わずに高感度にアミノ酸鏡像体を分離・分析できる手法の開発を目的とした． キラルクラウンエーテルを固定相に据えた光学分割カラムによるアミノ酸鏡像体分離を行い，さらに MS/MS パラメーターの最適化を行うことで，高感度かつ高再現性を示す世界最高レベルのハイスループット D-アミノ酸定量分析法を確立した．また，本手法を黒酢中の D-アミノ酸定量分析に供し，結果として nmol/mL レベルの極低濃度の D-アミノ酸の測定に成功した．これらの結果は，本手法が食品を初めとする様々なサンプル中の D-アミノ酸の定量分析に応用できる新規分析手法としての大きな可能性を有することを実証した．

D-amino acid, LC-MS/MS, Quantitative analysis

発表責任者：中野洋介（yosuke_nakano@bio.eng.osaka-u.ac.jp）

講演番号：3A04a03
講演日時：3 月 19 日 09:50～ A 校舎 04 会場

食材中の遊離アミノ酸組成表の構築および調理過程での遊離アミノ酸の動態の検討
Construction of free amino acids composition database from food and examination of the change of composition of free amino acids during cooking process
○伊藤 日向子[1]、植野 洋志[2]、菊崎 泰枝[1] ([1]奈良女子大院、[2]龍谷大農)
○Hinako ITO[1], Hiroshi Ueno[2], Hiroe Kikuzaki[1] ([1]Nara Woman's Univ, [2]Ryukoku Univ)

【目的】アミノ酸は動植物の生体内でそれぞれ異なる生理作用を有することが判明している。例えば、グルタミン酸は食べ物のうま味成分であるが、脊椎動物の中枢神経では興奮性神経伝達物質として作用する。また、非タンパク質性アミノ酸のγ-アミノ酪酸（GABA）は抑制性神経伝達物質として、グルタミン酸と同様に脊椎動物の中枢神経を制御している。GABA は血圧上昇抑制作用など、ヒト体内での機能性も知られており、特定保健用食品成分として GABA が添加された食品が多数流通している。本研究の先行研究で果実中に GABA が頻繁に検出されたことをきっかけに、様々な食品中での GABA 等の遊離アミノ酸の相当量の含有が明らかになった。しかし、国内外で公開されている食品のアミノ酸データベースには酸加水分解反応後のタンパク質性アミノ酸の定量値が主に記載されている。加水分解で分解されるトリプトファン・グルタミン・アスパラギンや、非タンパク質性アミノ酸である GABA・ヒドロキシプロリン・オルニチン・シトルリンなどのアミノ酸組成は含まれていない。また、野菜・果実中の遊離アミノ酸量の文献の多くはおよそ 40 年以上前に報告されたものである。植物・動物体内のアミノ酸の生理作用に関する研究は発展段階にあり、高等動物体内の D-アミノ酸の存在など、近年明らかになったことも多くある。今後アミノ酸の生体内での機能が明らかになることで、その効果を期待した食品等の開発もさらに加速されると考えられる。その中で、食材中の遊離アミノ酸含有量の情報のニーズが高まると考えられ、本研究では食品中の遊離アミノ酸データベースの構築を目指した。野菜などは果物と異なって加熱して食されるケースが多いことから、本研究では生の状態に加えて、茹で・焼きなどの加熱調理後の食材中の遊離アミノ酸組成の変化も併せて検討した。
【方法】緩衝液を抽出溶媒として用いて食品中の遊離アミノ酸を抽出し、除タンパク、タンパク定量を行った後、4- Fluoro-7-nitrobenzofurazan(NBD-F)によってアミノ酸を誘導体化し、超高速アミノ酸分析機(HITACHI La Chrom Ultra)で各遊離アミノ酸の同定・定量を行った。
【結果】緩衝液での抽出方法を確立し、遊離アミノ酸の同定・定量し、約 180 種類の野菜・果物を主とした食材のデータベース化を行った。また、加熱調理による遊離アミノ酸量の変化について、数種類の野菜で検討した。

Free amino acids, GABA, Food

講演番号：3A04a04
講演日時：3 月 19 日 10:05～ A 校舎 04 会場

# カイワレダイコンにおけるジャスモン酸メチルによるアミノ酸蓄積

# Accumulation of amino acids in radish sprout induced by methyl jasmonate

○野下 浩二、田母神 繁（秋田県大・生資科）
○Koji NOGE, Shigeru TAMOGAMI (Akita Pref. Univ.)

【背景と目的】植物は，昆虫の食害に対して，防御に関わる二次代謝産物を生産するなど様々な応答を示す．我々は，雑草のオオイタドリが昆虫食害を受けた時に生成するアミノ酸由来の二次代謝産物の生合成研究を進める過程で，二次代謝産物の生成に先立ち，その葉にアミノ酸が蓄積すること，この現象が植物ホルモン様活性を有するジャスモン酸メチル (MeJA) 処理で再現されることを見出した [1]．MeJA 処理によるアミノ酸蓄積という現象が作物でも起こるのであれば，アミノ酸という栄養素をより豊富に含む作物を作り出すことができると考える．実際，オオイタドリと同じタデ科の作物であるソバを MeJA 処理すると，そのスプラウト中にトリプトファンが蓄積することを確認している．そこで，タデ科以外の作物でも同様にアミノ酸蓄積が認められるかを検証するために，まず代表的なスプラウトであるカイワレダイコンを材料に，MeJA 処理によるアミノ酸の質および量的な変化を調べた．また，カイワレダイコンには辛味成分としてアミノ酸を前駆体とするグルコシノレートが含まれることが知られる．MeJA 処理によるグルコシノレート量の変化も合わせて調べた．
【方法】カイワレダイコンを播種後約 1 週間栽培し，スプラウトを得た．これをろ紙に含ませた MeJA とともに容器に密閉した後，20 ºC，明所に静置し，揮発した MeJA をカイワレダイコンに取り込ませた．MeJA を加えずに同条件下に置いたものを対照区とした．処理 24 時間後に，可食部である地上部を切り取り，0.1 M HCl 中で破砕し，陽イオン交換クロマトグラフィーにより精製後，エタノール中でクロロギ酸エチルにより誘導体化し，GC–MS でアミノ酸を定量した．一方，グルコシノレートは細胞が破砕されると，イソチオシアネートへと酵素的に変換される．そこで，ヘキサンを重層した水溶液中でカイワレダイコンを破砕し，グルコシノレートから生じたイソチオシアネートをヘキサン層に回収し，これを GC–MS で分析することで，間接的にグルコシノレート量を評価した．
【結果と考察】対照区のカイワレダイコンの地上部からは，Ala，Val，Leu，Ile，Pro，Phe，Lys，His，Tyr，Trp の 10 種類が検出された．MeJA 処理により，アミノ酸組成に変化は認められなかったが，新鮮重 1 g あたり，His が約 3 倍，Val，Leu，Ile，Tyr が約 2 倍，Phe，Lys が約 1.5 倍に増加した．カイワレダイコンでは Trp の増加が認められず，MeJA 処理に対するアミノ酸蓄積のパターンは植物種によって異なることが示唆された．一方，MeJA 処理により，地上部ではイソチオシアネート量の変動が顕著ではなかったが，根ではイソチオシアネート量が増加する傾向が見られた．

[1] Noge and Tamogami, *FEBS Lett.* **587**:1811–1817 (2013)

jasmonic acid, amino acid, *Raphanus sativus* L.

発表責任者：野下浩二（noge@akita-pu.ac.jp）

講演番号：3A04a05
講演日時：3 月 19 日 10:20～ A 校舎 04 会場

タウリンによる遺伝子発現制御機構の解析
Analysis of regulatory mechanism of gene expression change by taurine
○和多利 研二[1]、井前 正人[2]、薩 秀夫[1]([1]前工大工、[2]大正製薬（株））
○Kenji Watari[1], Masato Imae[2], Hideo Satsu[1] ([1]Maebashi Inst. Tech., [2]Taisho Pharma.)

【目的】タウリンは硫酸基を有するβ-アミノ酸の一種であり、通常生体内に遊離の状態で高濃度存在する。タウリンは魚介類に多く含まれており主に食品として摂取された後、生体内で多彩な生理作用を示すことが報告されている。しかしながら、タウリンが生体内において遺伝子発現に及ぼす影響およびその制御機構については不明な点が多かった。演者らはこれまで、ヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞においてタウリンが thioredoxin interacting protein（TXNIP）やがん抑制遺伝子 p16 の mRNA 発現を亢進することを報告してきた。そこで本研究では、タウリンによる遺伝子発現制御が肝臓など他の組織由来培養細胞でもみられるか検討するとともに、その特性や作用機序についてさらに解析することとした。
【方法】ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 細胞を 24wellplate に播種して培養した後、タウリンを添加してインキュベートした。一定時間後 RNA を回収して real-time PCR をおこない、mRNA 発現レベルの変化を検討した。また同様にタウリン添加後 HepG2 細胞よりタンパク質を回収し、ウェスタンブロット法によりタンパク質レベルでの発現変化を解析した。
【結果・考察】タウリンが TXNIP および p16 の mRNA 発現量に及ぼす影響について HepG2 細胞について検討した結果、HepG2 細胞においても Caco-2 細胞と同様に TXNIP および p16 の mRNA 発現量の増加がみられ、さらに p16 についてはタンパクレベルでの増加も確認された。そこで HepG2 細胞を用いて、タウリンの構造類似体が p16 の mRNA 発現量の及ぼす影響を調べることとし、タウリンの吸収を司るタウリントランスポーターの基質であるヒポタウリン、β-アラニン、GABA について解析した。その結果、いずれのタウリン構造類似体も p16 の mRNA 発現量を増加させず、タウリンによる p16 の mRNA 発現亢進はタウリンの構造に極めて選択的であることが示唆された。またタウリンによる p16 の mRNA 発現亢進における MAP キナーゼの関与を調べることとし、p38MAPK 阻害剤、ERK 経路阻害剤、JNK 阻害剤を用いてそれぞれ検討した結果、ERK 経路阻害剤である PD98059 を添加することによってタウリンによる p16 の mRNA 発現増加が有意に抑制された。これよりタウリンによる p16 の mRNA 発現亢進には ERK 経路が関与していることが示唆された。

taurine, HepG2, p16

講演番号：3A04a06
講演日時：3 月 19 日 10:45～ A 校舎 04 会場

# じゃがいもの新規機能性成分探索に向けたフラクションライブラリーの作製

# Construction of a potato fraction library for searching new functional constituents

○野川 俊彦[1]、二村 友史[1]、岡野 亜紀子[1]、石原 克之[2]、須藤 麻里[2]、伊藤 政喜[2]、長田 裕之[1]（[1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[2]カルビー（株））
○Toshihiko NOGAWA[1], Yushi FUTAMURA[1], Akiko OKANO[1], Katsuyuki ISHIHARA[2], Mari SUTO[2], Masayoshi ITO[2], Hiroyuki OSADA[1] ([1]RIKEN CSRS, Chemical Biology, [2]Calbee, Inc.)

【目的】

じゃがいもは食用として世界中で栽培されている植物であり、可食部である塊茎にはデンプンに加えビタミン C や B 群、クロロゲン酸をはじめとするポリフェノール類などの機能性成分が含まれている。これらに加えポテトグリコアルカロイド（PGA）などの毒性成分も含まれている。しかし、じゃがいも特異的に含有されるような二次代謝産物の研究が本格的に行われた例はない。また、一般的に食料として利用されている部位は塊茎のみであり、葉や茎などは塊茎の収穫後大量に廃棄されている。一方、我々の研究室では微生物の生産する二次代謝産物に注目し、有用代謝産物の探索を行ってきた。その方法として抽出物を粗分画したフラクションライブラリーを作製し、活性評価や化合物探索に利用している。この方法により多様な構造の有用二次代謝産物を単離している。今回、この方法をじゃがいもの機能性成分探索に応用することとした。

【方法】

品種や産地の異なるじゃがいもの花、葉、茎、果、皮、根をそれぞれ凍結乾燥後メタノールにて抽出し、それぞれのエキスを調製した。各抽出物の一部を用いて極性による液液分配と酸塩基性度による分配を行い、前者より 4 種の抽出物（ヘキサン、酢酸エチル、ブタノールおよび水可溶性画分）、後者より 3 種の抽出物（酸性画分、塩基性画分および中性画分）を調製した。各分配抽出物を中圧液体クロマトグラフィーによりそれぞれ 8 分画することでフラクション（粗精製物）を作製した。作製したフラクションの一部を用いて活性評価（10 mg/mL DMSO 溶液）および LC/MS 分析用（1 mg/mL MeOH 溶液）のサンプルを調製し、フラクションライブラリーとして整備した。活性は、がん細胞に対する細胞毒性、抗菌活性および抗マラリア活性を評価した。

【結果】

品種、産地、部位の異なる約 50 種の抽出物より、約 1,700 フラクションを作製した。活性評価の結果より、花から作製したフラクションに強い細胞毒性を有することが明らかとなった。LC/MS 分析結果からは、花にじゃがいもの毒性成分として知られるソラニン、チャコニンなどの PGA が多く含まれることが示された。しかし、フラクションの分析結果より PGA 以外にも細胞毒性を有すると思われる成分の存在が示唆された。細胞毒性以外にも、塊茎の皮より作製したフラクションが抗マラリア活性を示した。今回、フラクションライブラリーの作製と活性評価について報告する。

potato, fraction library, constituent

講演番号：3A04a07
講演日時：3 月 19 日 11:00～ A 校舎 04 会場

# じゃがいもフラクションライブラリーを用いた抗糖化活性の検討

# Anti-glycation activity of a potato fraction library

○須藤 麻里[1]、吉原 潮梨[1]、石原 克之[1]、野川 俊彦[2]、二村 友史[2]、岡野 亜紀子[2]、伊藤 政喜[1]、長田 裕之[2] ([1]カルビー（株）、[2]理研 CSRS／ケミカルバイオロジー)
○Mari SUTO[1], Shiori YOSHIHARA[1], Katsuyuki ISHIHARA[1], Toshihiko NOGAWA[2], Yushi FUTAMURA[2], Akiko OKANO[2], Masayoshi ITO[1], Hiroyuki OSADA[2] ([1]Calbee, Inc., [2]Chemical Biology Research Group, RIKEN CSRS)

【目的】

糖化反応とは、体内にあるタンパク質と糖が非酵素的に結合する反応であり、最終産物として Advanced Glycation End Products（AGEs）を生成する。AGEs は加齢とともに体内に蓄積する。皮膚中に蓄積すると、くすみ、しわ、しみ等の皮膚老化が進行し、また血中や骨中に蓄積すると動脈硬化、骨粗鬆症が発症する。糖尿病では生体タンパク質の糖化が進行し AGEs が蓄積することにより、合併症が発症・進行することが知られている。このようなことから生体内の糖化反応を抑制することは、加齢や糖尿病に伴う疾病の予防・改善に繋がるため非常に重要である。本研究はじゃがいも未利用資源の有効活用法の開発を目的とし、じゃがいも植物体から作製したフラクションライブラリーの抗糖化活性を評価した。

【方法】

活性評価に用いたじゃがいもフラクションライブラリーは、理化学研究所で作製したものを用いた。じゃがいも各部位のメタノール抽出物より 7 つの溶媒分画（ヘキサン、酢酸エチル、ブタノール、水、酸性、塩基性および中性画分）を調製後、それぞれを MPLC により分画しライブラリーとした。抗糖化活性は、ヒト血清アルブミンおよび I 型コラーゲンをモデルタンパク質として、グルコースと 60℃で 40 時間および 14 日間反応させることにより生じる蛍光性 AGEs の蛍光強度（励起波長 370 nm、蛍光波長 440 nm）により評価した。フラクションは、活性評価用ライブラリーを DMSO にて 10 倍希釈（1 mg/mL）および 100 倍希釈（0.1 mg/mL）して用いた。反応系に各フラクション希釈溶液を添加した場合の蛍光強度の値から、AGEs 生成阻害率(%)および $IC_{50}$ 値(μg/mL)を算出した。

【結果】

いくつかのフラクションに高い AGEs 生成阻害作用が認められた。植物体の部位毎およびフラクションの画分毎に活性強度を比較すると、部位では「皮、葉、花」の活性が高く、「茎、根」の活性が低かった。画分毎では高極性画分であるブタノール画分の活性が高く、脂溶性画分であるヘキサン画分と塩基性画分では低い活性を示した。全体的に活性成分はブタノール画分の特定のフラクションに集中していた。最も活性の強かったものは、「皮のブタノール画分」であり、この画分に含まれる成分について、LC/MS を用いて分析を行った結果、ポリフェノール類が含まれていることが明らかとなった。現在、含有ポリフェノールの種類と量、そしてその抗糖化活性について検討を進めている。

Potato, fraction library, Anti-glycation

発表責任者：須藤麻里（m_suto2@calbee.co.jp）

講演番号：3A04a08
講演日時：3 月 19 日 11:15～ A 校舎 04 会場

# アルコール飲料中における新規抗酸化製剤の作用と乳化安定性
# Effect and Stability of Antioxidative Formulation in Alcoholic Beverages

○門脇 章夫、原田 翔太、大久保 泰宏（太陽化学株式会社）
○Akio KADOWAKI, Shota HARADA, Yasuhiro OKUBO (TAIYO KAGAKU Co. Ltd.)

【目的】飲食品において乳化組成物の利用用途は広く、油溶性の香料、酸化防止剤、機能性素材などを安定的に飲食品へ添加する目的で使用される。例えば、酸化防止剤は飲食品の風味劣化を防止する添加物として幅広く使用されており、目的に応じて水溶性、油溶性のものが用いられるが、油溶性の酸化防止剤を水系飲食品へ直接添加することは困難であるため、界面活性剤を用いて水中に分散可能な乳化組成物として調製を行う。我々はこれまでに、独自の乳化技術で油溶性抗酸化素材と水溶性抗酸化素材を一剤化した抗酸化製剤（TS）を開発するとともに、乳製品や果汁飲料など各種飲食品において乳化粒子径制御による効率的な酸化防止効果の発現を報告してきた [1-4]。しかしながら、一般に乳化組成物は高濃度のアルコールやポリフェノールを含む飲料中では乳化破壊の影響を受け不安定となることが知られており、長期間安定的に乳化物を維持することが困難となる。そこで本年度はアルコール飲料中での TS の安定性を評価し、酸化防止効果へ及ぼす影響について検証を行った。

【方法】油溶性抗酸化素材と水溶性抗酸化素材を界面活性剤により一剤化した乳化組成物として、乳化粒子径をコントロールした TS、および通常乳化品を調製した。各乳化組成物をアルコール濃度の異なる各種アルコール飲料に添加し、乳化安定性の評価を行った。また、各種機器分析によりアルコール飲料中の酸化劣化物を測定し、乳化組成物の酸化防止効果を評価した。

【結果】各種アルコール飲料に調製した乳化組成物を添加したところ、通常乳化品は直ちにアルコールによる乳化破壊の影響を受け、油溶性成分の分離が発生した。一方で TS はアルコールに対して安定性に優れ、長期間安定的に乳化物を維持するとともに、高い酸化防止効果が持続することを確認した。

1） 日本農芸化学会 2013 年度大会 要旨集 2A16p20
2） 日本農芸化学会 2014 年度大会 要旨集 2B03p03
3） 日本農芸化学会 2015 年度大会 要旨集 2F26a02
4） 日本農芸化学会 2016 年度大会 要旨集 2E023

antioxidant, emulsion, alcoholic beverage

講演番号：3A04a09
講演日時：3 月 19 日 11:30～ A 校舎 04 会場

# 日本生まれのフレーバーホップ「ソラチエース」の特徴香について

# Identification and characterization of unique flavor compounds contributing to the specific flavor of Japanese hop 'SORACHI ACE'

○谷川 篤史[1]、實方 綾子[2]、蛸井 潔[1]、松本 一郎[1]、中山 康行[1] ([1]サッポロビール株式会社、[2]サッポロホールディング株式会社)
○Atsushi Tanigawa[1], Ayako Sanekata[2], kiyoshi Takoi[1], Ichiro Matsumoto[1], Yasuyuki Nakayama[1] ([1]SAPPORO BREWERIES LTD., [2]SAPPORO HOLDINGS LTD.)

【目的】
ビールの市場はピルスナータイプと呼ばれるビールが主流であるが、2000 年代に北米を発端としたクラフトビールブームによって、様々なタイプのビールが醸造されているようになった。ホップはビールの香りを変化させる重要な原料であり、品種によりその香りの特性が異なる。特にフレーバーホップと呼ばれるホップ品種群が特徴的な香りを作り出す品種として重要視されている。その中でも北米のクラフトビールシーンを中心に、サッポロビールが 30 年以上前に育種した「ソラチエース」がユニークな香りを作り出す品種として脚光を浴びている。ソラチエースで醸造したビールの香りは、松、森林、ディルハーブ、レモンなどと表現されているが、その香りの成分は特定できていなかった。そこで、ソラチエースに含まれている香りの成分の解明を行った。
【方法・結果】
通常のアロマホップ、ソラチエースの 2 種類のホップで醸造したビールを 2 次元 GC-O、SPME-GC-MS を用い比較分析を行った。その結果、ソラチエースに特異的に多く含まれている成分がゲラン酸であることを特定した。更にゲラン酸そのものは閾値が高い成分であるものの、他のホップの香り成分と相互作用することでソラチエース特有のレモン様の香りを形成することを官能評価によって明らかにした。また、ホップの添加時期が異なったビールを醸造したところ、ゲラン酸の含有量は変化しないが、その他のホップの成分が変化するため、発酵中にホップを添加するドライホッピング法がレモン様の特徴を出すために適した方法であると考えられた。

craft beer, flavor hop, geranic acid

発表責任者：谷川篤史（atsushi.tanigawa@sapporobeer.co.jp）

講演番号：3A04a10
講演日時：3 月 19 日 11:45～ A 校舎 04 会場

甘味抑制物質ラクチゾール及びその誘導体に対する甘味抑制能の検証
Validation of inhibitory activities of sweet taste inhibitors, lactisole and its derivatives

○中北 智哉[1]、石田 明子[2]、小林 拓也[1]、広川 貴次[3]、橋本 誠[2]、三坂 巧[4]（[1]京大院・医、[2]北大院・農、[3]産総研、[4]東大院農生科・応生化）
○ Tomoya NAKAGITA[1], Akiko ISHIDA[2], Takuya KOBAYASHI[1], Takatsugu HIROKAWA[3], Makoto HASHIMOTO[2], Takumi MISAKA[4] ([1]Grad. Sch. Med., Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. Agri., Hokkaido Univ., [3]AIST, [4]Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo)

**[背景・目的]**

甘味受容体は G タンパク質共役型受容体(GPCR)に分類される T1R2 及び T1R3 がヘテロダイマーを形成することで機能することが知られている。甘味受容体には複数のリガンド作用部位が存在し、スクロース及び種々の人工甘味料は T1R2 の膜外領域に作用する一方、甘味抑制物質であるラクチゾール、及びその類似構造を有する 2,4-DP は T1R3 の膜貫通領域に作用することが明らかとなっている。

我々はこれまでに、T1R3 膜貫通領域に対する変異体解析を実施することにより、これら甘味抑制物質の作用部位を同定し、ドッキングモデルを作製することに成功している（2015 年度大会にて発表済み）。そこで本研究においては、このモデルを参考に、さらに作用部位に適合する高親和性の甘味抑制物質の開発を目指すとともに、作製したモデルの確からしさを検証した。

**[方法・結果]**

光学活性を有する乳酸メチルと、種々の置換基を有するフェノールを混合し、光延反応により乳酸の立体が反転した化合物を合成し、それを脱保護することで、(S)体及び(R)体のラクチゾール骨格を有する新規化合物群を得ることに成功した。

これらの化合物を甘味物質とともに甘味受容体安定発現細胞へ投与し、その細胞応答の強度を測定することにより、各々の化合物の $IC_{50}$ 値を測定した。

その結果、2,4-DP のクロロ基の位置を変えた誘導体、及び他のハロゲンに置換した誘導体等では、概ねモデルから予想された阻害活性を反映する結果が得られたことから、モデルの確からしさが支持されたものと考えられた。今後は今回の結果を踏まえ、更なる高親和性を有する甘味抑制物質の開発を目指す予定である。

本研究の一部は総合科学技術・イノベーション会議の SIP(戦略的イノベーション創造プログラム)「次世代農林水産業創造技術」よって実施された。

sweet-taste-receptor, inhibitor, modeling

発表責任者：中北　智哉（t.nakagita@mfour.med.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3A04p01
講演日時：3 月 19 日 14:00～ A 校舎 04 会場

フラボノイドの分子会合に寄与する構造特性
Structural characteristics of flavonoids for formation of self-association
○豊島 亮太、辻 愛、坂本 裕香、川畑 球一、石井 剛志（神戸学院大栄養）
○Ryota TOYOSHIMA, Ai TSUJI, Yuka SAKAMOTO, Kyuichi KAWABATA, Takeshi ISHII (Kobe Gakuin Univ.)

【目的】植物性食品に含まれるフラボノイドは、水溶液中において単量体として存在するだけでなく、分子間で相互作用することで分子会合体としても存在することが知られている。この分子会合体の形成は、食品の安定性や呈味性などに影響することに加えて、機能性分子としての吸収性や生理活性にも影響すると考えられているが、フラボノイドの分子会合に寄与する構造特性は解明されていない。先行研究において我々は、会合したポリフェノールをネイティブ電気泳動によって簡易的に分析する方法を構築し、フラバノール類(緑茶カテキン類)とその重合物(紅茶テアフラビン類)の分子会合に、ガロイル基が寄与することを報告している。本研究では、フラボノイドとその類縁化合物の分子会合性を網羅的に評価することで、分子会合に寄与する構造特性を解明することを目的とする。
【方法・結果】フラバノール類、フラバン類、フラボノール類、フラボン類、イソフラボン類およびそれらの類縁化合物を試料とし、構築した方法により得られる泳動像から各試料の分子会合性を評価した。本方法では、水溶液中における分子会合体の安定性が、比較的に高いものはネイティブ電気泳動において高分子量領域に泳動されるが、比較的に低いものは高分子量領域から低分子量領域にかけて泳動される。また、分子会合体を形成しない(し難い)ものは、先端部や低分子量領域に泳動される。泳動像を解析した結果、高分子量領域のバンドは、分子内にガロイル基を持つ全ての試料で確認できたが、分子内にガロイル基を持たない試料では確認できなかった。高分子量から低分子量領域におよぶスメアなバンドは、B 環に 3 つの水酸基をもつエピガロカテキンやミリセチンなどで確認できた。ミリセチンの構造を基盤として詳細な解析を行った結果、B 環水酸基の減少・消失、A 環 5 位の水酸基の消失および C 環 3 位への糖の結合によって、分子会合性が減弱・消失することが明らかになった。
【考察】ガロイル基を持たないフラボノイドでは、B 環水酸基の数が減少することで疎水性が高上するとともに分子会合性が減弱・消失することから、B 環水酸基の存在によって生じる親水性領域が会合体の形成に寄与していると考えられる。また、A 環 5 位の水酸基が消失することで疎水性が低下するとともに分子会合性が消失することから、A 環 5 位の水酸基と C 環 4 位のカルボニルの水素結合で形成する疑似的な六員環構造の存在によって生じる疎水性領域が、会合体の形成に寄与していると考えられる。C 環 3 位は、ガロイル基の結合により疎水性と会合安定性が高上し、水酸基への糖の結合により疎水性と会合安定性が低下することから、会合体の安定化に重要な部位であると考えられる。以上より、フラボノイドの分子会合には両親媒性を備えた対極的構造が重要であることが示された。

flavonoid, interaction, polyphenol

発表責任者：石井剛志（ishii_t@nutr.kobegakuin.ac.jp）

講演番号：3A04p02
講演日時：3 月 19 日 14:15～ A 校舎 04 会場

# ブドウ果実の水溶性フェノール化合物と酵素による剥皮性についての品種間差の検討

# Varietal differences in phenolic composition and enzymatical peelability in several commercial table grapes

○堀西 朝子[1]、児玉 祥基[1]、滝沢 潤[2]、竹内 正彦[2]、尾崎 嘉彦[1]([1]近大・生物理工、[2]長野県農工研)
○Asako HORINISHI[1], Yoshiki KODAMA[1], Jun TAKIZAWA[2], Masahiko TAKEUCHI[2], Yoshihiko OZAKI[1] ([1]Kindai Univ., [2]Agric. Technol. Inst of Nagano Feramers' Fed.)

【目的】演者らはこれまでに、微生物酵素を利用した果実類の剥皮加工技術の開発を進めてきた。この中で、剥皮工程での酵素液への浸漬時に果実から溶出するフェノール性化合物が酵素剤の活性を阻害することで、剥皮性に影響を与えている可能性を指摘した[1)]。本研究では、この現象をさらに詳細に検討するために、ブドウ果実をモデルとし、溶液への浸漬により溶出するフェノール性化合物の濃度と剥皮性の関係およびフェノール性化合物による酵素活性の阻害について検討を行った。
【方法】ブドウ主要品種から果径、果皮色別に代表的なものとして「巨峰」(大粒黒)、「安芸クイーン」(大粒赤)、「シャインマスカット」(大粒白)、「キャンベルアーリー」(中粒黒)、「ナイアガラ」(中粒白)、「デラウェア」(小粒赤) の 6 品種を選び、検討を行った。果梗を切断して分離した果粒を用い、角皮への穿孔、短時間の加熱などの前処理[2)]を行った後に、果実と等重量の 0.1%アクレモセルラーゼ KM (協和化成) 水溶液に浸漬し、30℃で保持し、果皮の離脱状態を観察した。また、果実を酵素処理する際と同様に蒸留水に浸漬し、浸出液を得た。浸出液に溶出するフェノール性化合物の濃度を Folin-ciocalteu 法により、組成を HPLC 法により分析した。また、浸出液による酵素剤中の Polygalacturonase および Cellulase 活性に及ぼす影響を評価した。
【結果】供試した 6 品種は、酵素処理による果皮の離脱状態により、(I) 前処理により損傷を受けた果皮の脱落が一部認められるが、果皮組織の崩壊はほとんど起こらない品種 (デラウェア、ナイアガラ、安芸クイーン)、(II) 穿孔処理を行った果実で果皮組織の崩壊が認められる品種 (巨峰、キャンベルアーリー、シャインマスカット) の２つのグループに大別することができた。浸漬液中のフェール性化合物の濃度は、小粒、中粒種が高く、大粒種が低い傾向があったが、中粒種のキャンベルアーリーで果皮組織の崩壊が認められ、大粒種の安芸クイーンで分解が認められないことから、フェノール性化合物の濃度のみで、果皮組織の崩壊性の差を説明することはできなかった。現在、各浸漬液に含まれるフェノール性化合物の組成および酵素活性の阻害について検討を進めている。

【引用文献】
1) 関拓也ら、日本食品保蔵科学会第 65 回大会講演要旨集 p70 (2016).
2) 野口真己ら日本国特許第 5916123 号 (2016) .

grape, phenolics, enzymatic peeling

講演番号：3A04p03
講演日時：3 月 19 日 14:30～ A 校舎 04 会場

RAPD 法を用いた国産ザクロの遺伝子パターンと機能性成分に関する検討
Study on genetic diversity using RAPD method and functional components of Japanese *Punica granatum L.*
○佐藤 沢子、成澤 直規、竹永 章生（日大院・生資科）
○Sawako SATO, Naoki NARISAWA, Fumio TAKENAGA (Nihon Univ.)

【目的・背景】ザクロ(*Punica granatum L.*)は世界中で食され、数千の品種が存在するといわれている。近年、アントシアニンやザクロのポリフェノール成分であるプニカラジンなどの抗酸化性物質の機能性成分が注目されているが、品種の違いや成熟過程毎による各種成分特性の違いは明らかとなっていない。本研究では、国産ザクロを対象として遺伝子解析による品種の特徴、並びに 8 月から 10 月にかけて経時的に各種機能性成分を調査した。
【方法】山梨県内の 2 種(Y-1、Y-2)、東京都内の 5 種(T-1～T-5)、茨城県 1 種(I-1)、チリ産 1 種(C-1)について RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)法を用いて品種同定した。種子を凍結乾燥後、細かく砕き、CTAB 法にて DNA を抽出した。10 塩基プライマーを用いて PCR 後、1.5%アガロース電気泳動後のバンドの差異を比較した。山梨県産の 2 種については 8 月から 10 月にかけて各 10～14 個体サンプリングし、果実の特徴と機能性成分を分析した。各果汁中のアントシアニンは 1%塩酸メタノールにて抽出し、520 nm の吸光度により評価した。抗酸化活性と総ポリフェノール量はそれぞれ DPPH ラジカル消去活性法、フォーリン・チオカルト法を用いた。プニカラジンは、HPLC(Prominence HPLC システム；島津製作所)にて測定し、カラムは Develosil ODS-UG-5(5 μm、4.6×250 mm；野村化学)、カラム温度は 40℃、移動相は 0.5%リン酸/アセトニトリルを用い、380 nm の波長で検出した。
【結果・考察】チリ産を含む計 9 サンプルを対象として RAPD 法によるバンドパターンを比較した結果、7 試料(Y-1、T-1、T-2、T-4、T-5、I-1、C-1)は類似性が高く、一方で Y-2、T-3 はこれらとは大きく異なることが明らかとなった。山梨県内の試料を 8 月から 10 月にかけて経時的にサンプリングし、果汁中のアントシアニン量を測定した結果、いずれも 10 月期に得られたものが最も高い値を示し、10 月期の試料では完熟の目安であるとされる実割れも確認された。果汁中の総ポリフェノール量は 8 月期の試料で最も高く、10 月期では 8 月期と比べ、約 35%程度低下した。また、プニカラジン量も総ポリフェノール量と同様の傾向を示した。果汁中の抗酸化性は 8 月期で最も高く、総ポリフェノール量と相関性が認められた。Y-1 と Y-2 の比較において、いずれの収穫時期においても果実の全重量、果汁量と pH に大きな差異は認められず、アントシアニン量や総ポリフェノール量においても同様であった。しかし、Y-2 においては果実全重量が収穫時期に従い増加しているにもかかわらず、可食部であるアリル(種衣)数には増加が見られなかった。現在、果汁中に含まれる有機酸や種子中に含まれる脂肪酸など、両試料の成分特性について解析中である。

*Punica granatum L.*, RAPD, functional properties

発表責任者：成澤直規（narisawa.naoki@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3A04p04
講演日時：3 月 19 日 14:45～ A 校舎 04 会場

# 腸内細菌群によるウロリチン類の生成機構に関する研究 (1)

# A study for metabolic pathway of urolithins in gut microbiota (1)

○工藤 眞丈、中島 賢則、山本 浩明 (（株）ダイセル)
○Masatake KUDOH, Takanori NAKAJIMA, Hiroaki YAMAMOTO (Daicel Corp.)

【目的】ザクロはスーパーフルーツとして食品、飲料などに使用されている。ザクロにはエラジタンニンやその加水分解物であるエラグ酸が主要ポリフェノールとして含まれており、これらが抗酸化、抗炎症等のアンチエイジング機能を有することが報告されている。最近、エラグ酸は腸内で腸内細菌による代謝を受け、ウロリチン類 (UROs)に変換されることが明らかになってきた。特に、ヒトにおける主要な代謝産物であるウロリチン A(URO-A)は、抗糖化作用、抗ロコモ、マイトファジーの促進作用などの機能を有することが報告され、抗老化機能を有する食品素材としての開発が期待されている。この URO-A がザクロの機能性の活性本体であると推測し、腸内細菌による UROs 生成機構の解析を目的として本研究に着手した。

【方法】エラグ酸を摂食した健常人の尿を用いて URO-A を生産するヒト(URO-A 生産者)を調査した。URO-A 生産者より糞便の提供を受け、本研究に利用した。UROs 生成試験は、最終濃度 1g/L のエラグ酸を含む ABB 培地（Oxoid 社製）に腸内細菌を植菌し、気相を $N_2/CO_2/H_2$=80/10/10 に置換し、37℃で嫌気条件下振盪培養により行った。培養濾液中の UROs は、HPLC により定量した。

【結果と考察】糞便から ABB 寒天培地を用いて単菌分離した。得られた微生物を、エラグ酸入りの ABB 培地で培養し、UROs 生成能を試験した。その結果、URO-A を生産する微生物は見出せなかったが、URO-C を生産する微生物が見出された。得られた URO-C 生産菌を 16S-rRNA 配列により簡易同定した結果、いずれも、Selma ら [1] の報告と同様に、*Gordonibacter* 属に属し、*G.pamelaeae* もしくは *G.urolithinfaciens* の類縁菌と同定された。

*G. pamelaeae* を用いて、UROs の生産条件を検討した結果、気相（$N_2/CO_2/H_2$=80/10/10）から $CO_2$ を抜いても URO-C 生成に影響しなかったが、$H_2$ を抜いた条件では URO-C は生成しなかった。また、$H_2$ の代わりに培地にギ酸を添加した結果、URO-C の生成が確認され、系中でギ酸から水素が生産されたと推察された。

糞便中に URO-A 生産菌が含まれることを確認するために、糞便を直接エラグ酸を含む ABB 培地に植菌し培養した結果、培養液中に URO-A の生産が確認できた。この培養液にグリセロールを添加して保存することにより、安定的に URO-A を生産可能な腸内細菌複合体を得ることが出来た。

現在、この URO-A を生産する腸内細菌複合体のメタゲノム解析を進めている。

1) Selma MV, et al., (2014) *Food Funct.*, **5**, 177-1784.

urolithin, gut microbiota, pomegranate

発表責任者：工藤　眞丈（ms_kudoh@jp.daicel.com）

講演番号：3A04p05
講演日時：3 月 19 日 15:00～ A 校舎 04 会場

IL-12 産生を誘導する *Lactobacillus crispatus*KT-11 株由来表層タンパクの特性付け
Characterization of *Lactobacillus crispatus*-derived cell components which induces interleukin-12 production from macrophages
○渡邉 樹、榊原 正樹、友清 帝、飛田 啓輔（株式会社キティー）
○ Itsuki WATANABE, Masaki SAKAKIBARA, Mikado TOMOKIYO, Keisuke TOBITA (KITII.corporation)

Lactobacillus crispatus KT-11 株（KT-11）は、マウス細胞培養系において Th1 を強く誘導する乳酸菌株として健康な乳幼児の糞便から分離された 1)。これまでに KT-11 は経口摂取でアトピー性皮膚炎およびアレルギー性鼻炎などのアレルギー疾患の改善作用やインフルエンザウイルス感染や歯周病などの感染症に対する予防的作用などが示されている。KT-11 の存在下でマウスマクロファージ様細胞株を培養すると、TLR2 を介した NFkB や ERK の活性化によってインターロイキン 12（IL-12）の産生が誘導されることが示唆されている。KT-11 の IL-12 誘導能は、プロテアーゼ K および塩化リチウム処理により低下する。一方で塩化リチウム抽出物には IL-12 誘導能が見られたことから、マウスマクロファージにおいて KT-11 が導く IL-12 産生の一部は表層タンパク質が関与している可能性がある。抽出した KT-11 表層タンパク質の IL-12 誘導能もプロテアーゼ K 処理などにより低下するが、他の処理による影響は明らかになっていない。そこで、本研究では KT-11 の食品としての健康への寄与に関するメカニズムを明らかにする事を目的とし、KT-11 表層タンパク質の特性を明らかにするため特性付けを行った。MRS 培地で 37℃、20h 培養した KT-11 と L.acidophillus および L.crispatus の分譲株の菌体及び表層タンパク抽出物を試験に供した。温度や酵素による影響をマウスマクロファージ様培養細胞である J774.1 と培養して培養上清中の IL-12 への影響を ELISA 法で測定して比較検討を行ったので報告する。

1)Tobita et al., J. Agric. Food Chem., 2010

*Lactobacillus crispatus*, interleukin-12, surface proteins

発表責任者：渡邉樹（itsuki_watanabe@kitii.co.jp）

講演番号：3A04p06
講演日時：3 月 19 日 15:25～ A 校舎 04 会場

# ビールのキレに及ぼすレトロネーザルアロマの影響

# Effect of retronasal aroma on *kire* of beer

○宮下 聖子、春名 謙一郎、菊池 かおり、岸本 徹、小林 稔、渡邊 哲也（アサヒビール株式会社）
○ Seiko MIYASHITA, Kenichiro HARUNA, Kaori KIKUCHI, Toru KISHIMOTO, Minoru KOBAYASHI, Tetsuya WATANABE (ASAHI BREWERIES, LTD.)

消費者がビールを飲んだときの「美味しさ」は様々な言葉で表現されるが、日本市場でビールの美味しさを表現する重要な用語が「コク」と「キレ」である。しかしながら、キレについては国際的に認められた用語、定義は存在しないため、日本国内では、一般的に、キレを「風味（味、香り）に落差があって、かつ突出した風味が残らないこと」と定義している。本研究では、ビールのコク、キレに関係する成分を調査し、特にキレに寄与する成分を明らかにすることを目的とした。

我々はまず、日本で市販されている主要 14 種類のビール類について、定量的な記述法による官能評価と機器分析による網羅的な成分分析を行い、その関連性について解析することにより、コクとキレに影響する成分の解明を試みた。機器分析により取得した成分データを説明変数、官能評価により取得したコク／キレ評点を目的変数として PLS 回帰分析した結果、コクは呈味成分データのみで良好な予測モデルが構築出来たのに対し、キレは呈味成分データと香気成分データの両方を用いた場合において良好な予測モデルが構築出来た。これらの結果は、コクは呈味成分の影響が強く、呈味成分だけでほぼ説明可能であったのに対し、キレには呈味と香気（レトロネーザルアロマ（RA））の両方が影響していることを示唆していた。食べ物の「美味しさ」や「風味の良さ」に RA が大きく関与することは良く知られている。さらに我々は、RA がビールのキレに直接的な影響を及ぼすかどうか調査した。

官能評価で最もキレの評価が高かったビール、及び顕著にキレの評価が低かったビール 2 種を実験試料とした。Retronasal Flavor Impression Screening System にて RA を比較した結果、ビール間で特徴的な差異が認められ、キレの評価が低いビールの RA は、エチルエステル、酢酸エステル、リナロール等の香気成分が、キレの評価が高いビールの RA よりも有意に多く含まれることが分かった。これらの香気成分群をキレの評価が高かったビールへ添加し、官能評価した結果、ビールのキレは有意に低下することを確認した。このことから、RA はビールのキレに影響することが示された。

beer, *kire*, retronasal aroma

講演番号：3A04p07
講演日時：3 月 19 日 15:40～ A 校舎 04 会場

# ビールのイソα酸組成の最適化による苦味のキレ制御

# Regulation of Bitter Crispness by Optimization of Compositional Profile of Iso-alpha Acid

○岸本 徹、女川 裕司、宮下 聖子、小林 稔、渡邊 哲也（アサヒビール(株)酒類技術研究所）
○Toru Kishimoto, Yuji Onagawa, Seiko Miyashita, Minoru Kobayashi, Tetsuya Watanabe (Asahi Breweries, Ltd)

本研究では、ビールの苦味成分であるイソα酸（iso-humulone）の組成が、苦味のキレに与える影響について調べた。Iso-humulone には 6 種類の異性体（trans/cis-iso-humulone、trans/cis-iso-cohumulone、trans/cis-iso-adhumulone）が存在し、それぞれの極性が異なる。極性が高いと、舌上に分布する苦味受容体への吸着能が低く受容体から脱離しやすいことが考えられ、苦味のキレに直接的な影響を及ぼすことが考えられる。
本研究では、苦味質の評価手法として専門パネルと味覚センサーを用いた客観的な苦味質評価手法を確立した。そして、イソ化ホップエキスから分取 HPLC を用いて 6 種類のイソα酸異性体（trans/cis-iso-humulone、trans/cis-iso-cohumulone、trans/cis-iso-adhumulone）を分取し、無ホップビールに対してそれら異性体（それぞれ trans 体、cis 体混合溶液）を等しい苦味価となるように添加した試料を調製した。これら試料について、専門パネルと味覚センサーを用いて後に残る苦味強度を評価した結果、最も極性の高い trans/cis-iso-cohumulone 添加試料の後に残る強度が最も弱く、trans/cis-iso-adhumulone 添加試料の苦味強度が最も強いことが分かり、異性体の違いによって後に残る苦味強度に差異が認められた。
ビール中の iso-cohumulone 比率を高めることがキレの向上につながる可能性が示されたことを受けて、iso-cohumulone 比率の上昇に有効であると考えられたドイツ産ヘラクレス種を用いて 200L スケールで試醸した。その結果、ヘラクレス種の使用比率が高いほど製品ビール中の iso-cohumulone 比率は上昇し、専門パネルによるキレの評価において有意にキレが向上していることを確認した。これらの結果より、ビール中のイソα酸組成を最適化することがビールのキレを制御する有効な手段であることが示された。

beer, hop, alpha acid

発表責任者：岸本　徹（toru.kishimoto@asahibeer.co.jp）

講演番号：3A04p08
講演日時：3 月 19 日 15:55～ A 校舎 04 会場

# ビールのオフフレーバーである 2-mercapto-3-methyl-1-butanol の前駆体の同定

# Identification of a precursor of 2-mercapto-3-methyl-1-butanol in beer.

○野場 重都[1]、八子 奈々[1]、坂井 浩晃[2]、小林 稔[1]、渡邊 哲也[1] ([1]アサヒビール、[2]アサヒグループホールディングス)
○ Shigekuni NOBA[1], Nana YAKO[1], Hiroaki SAKAI[2], Minoru KOBAYASHI[1], Tetsuya WATANABE[1] ([1]Asahi Breweries, Ltd., [2]Asahi Group Holdings, Ltd.)

うまいビールの要件は、「琥珀色で清澄」「きめ細かな白い泡」「良質な味（苦み）と香り」「特有の清涼感・爽快感」「コクがあり飲み飽きない」等、さまざまに表現される。このようにビールの持つうまさについて統一的定義は困難であるが、アサヒビールでは「不快臭味（オフフレーバー）がなく、洗練された香味を有すること」をひとつの定義としている。

ビールのオフフレーバーに、原料、醸造工程の異常、製品の保管状況等によって発生する含硫化合物がある。含硫化合物は、非常に閾値が低い化合物が多く、極微量でもビールの香味に大きな影響を与えるため、その制御は非常に重要である。この含硫化合物のひとつに、タマネギや汗のような匂いをもつ 2-mercapto-3-methyl-1-butanol（2M3MB）が知られている。2M3MB はビールの元となる麦汁には存在せず、酵母による発酵を経て生成する。このため麦汁には、2M3MB の前駆体が存在すると予想されていたが、その前駆体については長年解明されていなかった。また、2M3MB の生成機構についてもいまだ不明な点が数多く残されている。

そこで本研究では、2M3MB の生成機構の解明を目指して、2M3MB 前駆体の探索を行った。ビール原料のひとつであるホップを使用せずに醸造すると、2M3MB が生成しないため、2M3MB の前駆体はホップ由来であると考えられた。そこで、発酵により 2M3MB を生成する成分を探索する試験系を構築し、イソ化ホップエキスから、蒸溜、順相クロマトグラフィ、分取 GC を用いて、GC/MS クロマトグラム上単一成分となるまで目的成分を精製した。得られた精製物について、GC/Q-TOF を用いて構造解析を行い、推定構造として 2,3-epoxy-3-methyl-butanal を得た。合成した 2,3-epoxy-3-methyl-butanal の GC における保持時間と MS スペクトルは、精製物と一致した。さらに、2,3-epoxy-3-methyl-butanal を無ホップ麦汁へ添加する発酵試験を実施したところ、発酵液から 2M3MB が検出された。この結果より、2M3MB の前駆体を同定したと結論づけた。

今後、酵母がどのように前駆体を代謝し、2M3MB へと変換していくかを突きとめていきたいと考えている。

beer, off-flavor, precursor

発表責任者：野場　重都（shigekuni.noba@asahibeer.co.jp）

講演番号：3A04p09
講演日時：3 月 19 日 16:10～ A 校舎 04 会場

シマグワワインの NMR メタボローム解析
NMR-based metabolomics of mulberry wine
○稲村 勇雅[1]、久米田 博之[1,2]、熊木 康裕[1]、大西 裕季[1]、菊川 峰志[1,2]、出村 誠[1,2]、小山 朗夫[3]、伊東 昌章[4]、岩波 俊介[5]、相沢 智康[1,2] ([1]北大院先端生命、[2]北大 GI-CoRE ソフトマターGS、[3]浦添市シルバー人材センター、[4]沖縄高専、[5]苫小牧高専)
○Yuga Inamura[1], Hiroyuki Kumeta[1,2], Yasuhiro Kumaki[1], Yuki Ohnishi[1], Takashi Kikukawa[1,2], Makoto Demura[1,2], Akio Koyama[3], Masaaki Itoh[4], Shunsuke Iwanami[5], Tomoyasu Aizawa[1,2] ([1]Fac. Adv. Life Sci. Hokkaido Univ., [2]Soft Matter GS, GI-CoRE Hokkaido Univ, [3]Urasoe Silver Human Resources Ctr., [4]NIT, Okinawa Coll., [5]NIT, Tomakomai Coll.)

【背景・目的】

養蚕業において蚕の飼料として広く栽培されてきたクワは、最近では多くの有用な栄養素が含まれている有用植物としても注目をされるようになっている。例えばクワの葉は葉産地を中心に茶として飲用された歴史を持ち、根皮、果実などは漢方薬としても利用されている。クワの果実の栄養成分としてはカルシウム、カリウム、鉄、ビタミン類が多い事が報告され、また抗酸化作用、眼精疲労や視力低下の予防・改善等について報告されているポリフェノールの一種であるアントシアニンも多く含有されている。一般にクワの果実は糖度が低く、醸造酒の原料には不向きとされるが、沖縄産のシマグワの果実は糖度が高いことから醸造酒の原料として活用することも期待され、その加工過程での呈味成分や機能性成分の変化の解析は、適切な醸造条件の検討に重要であると考えられる。

近年、食品の成分や品質の解析で注目される技術としてメタボローム解析がある。メタボローム解析は対象に含まれる代謝物としての低分子化合物を網羅的に調べる手法であり、ブドウ果汁を醸造した一般的なワインについては、品種判別や品質予測に関する研究報告が多くなされている。その一方でクワの果汁を含めたブドウ以外の果汁を原料としたフルーツワインについての知見は少ない。そこで本研究ではクワの果汁を原料としたワインを対象として NMR を用いたメタボローム解析を行い、その醸造過程の検討と品質評価への応用を検討することを目的とした。

【実験・結果】

初期的な検討として、醸造用酵母 2 種(UCD522、BM4X4)を用いて醸造を行ったワインを対象として $^{1}$H NMR スペクトルを測定し、それぞれの代謝物の解析を chenomx NMR suite software 8.2 を用いて行った。他のフルーツワインの検討例として、ハスカップ果汁を原料として醸造を行ったワインでの NMR 測定用試料調製条件等を参照にして、各種測定と解析を進めた。その結果、アミノ酸、アルコール類、糖類、有機酸類について同定と定量に成功した。また、各酵母間の代謝物の含有量の比較で特徴的な差異が見られ、特にグルコースやフルクトース等の糖類、クエン酸や乳酸等の有機酸類、グリセロールの差異が大きかった。現在、ポリフェノール等の代謝物について 2 次元 NMR 等を用いて同定を進めると共に、より広範な醸造条件での成分の比較と検討を進めている。

mulberry, wine, NMR

発表責任者：相沢　智康（aizawa@sci.hokudai.ac.jp）

講演番号：3A04p10
講演日時：3 月 19 日 16:25～ A 校舎 04 会場

固相誘導体化法を用いた黒コショウの GC/MS メタボローム解析手法
Analysis of the components in Black pepper using in-SPE derivatization method for GC-MS metabolome analysis

○恩田 浩幸[1]、杉立 久仁代[2]、佐々野 僚一[3]、松尾 俊介[3]、佐川 岳人[1]、福崎 英一郎[4]([1]エスビー食品、[2]アジレント・テクノロジー、[3]アイスティサイエンス、[4]阪大院・工・生命先端)
○Hiroyuki ONDA[1], Kuniyo SUGITATE[2], Ryoichi SASANO[3], Syunsuke MATSUO[3], Takehito SAGAWA[1], Eiichiro FUKUSAKI[4] ([1]S&B foods Inc., [2]Agilent Technologies Japan, Ltd., [3]AiSTI SCIECE co., Ltd., [4]Dept. Mat. Life Sci., Osaka Univ.)

【目的】近年、メタボローム解析手法を用いた食品の品質評価が盛んに行われるようになっている。特に、アミノ酸などの不揮発性成分を誘導体化した GC/MS 分析は広く普及している。メタボローム解析を行う際に用いられる前処理手法として Bligh & Dyer 法が用いられるが、多検体の試料を同時に処理する上では、抽出および誘導体化の工程には長時間を有することが問題点であった。しかし最近では、固相カラム上で短時間かつ容易に誘導体化を行う固相誘導体化法も提唱されている。そこで本研究では、固相誘導体化法を黒コショウのメタボローム解析に適用すべく、その前処理に関する検討を行った。黒コショウは広く普及している香辛料の一つである。しかしながら、これまで黒コショウの代謝物に着目したメタボローム研究は、ほとんど行われていなかった。

【実験方法・結果】試料には、インド産黒コショウを使用した。そして Bligh & Dyer 法と固相誘導体化法の両手法で前処理を行い、アミノ酸および有機酸に焦点を絞り GC/MS 分析を実施した。固相誘導体化法については、Bligh and Dyer 法で採用されている抽出法に併せて、アセトニトリル水溶液による抽出も行い比較分析を行った。その結果、アセトニトリル水溶液抽出を行った後に固相誘導体化を行った場合、安定的にアミノ酸および有機酸を検出することができ、Bligh and Dyer 法と同等の結果となった。次に、固相カラムの最適負荷条件について検討を行ない、pH 調整、および固相カラム負荷量を調整することで、高い再現性が得られた。さらに、黒コショウ中に含まれる一部アミノ酸および有機酸について、標準添加法を用いて定量した。これらの結果より、アセトニトリル水溶液抽出と固相誘導体化法を組み合わせることで、黒コショウのメタボローム解析が、迅速かつ容易にできる可能性が示唆された。

Black pepper, Metabolome analysis, In-SPE derivatization method

発表責任者：恩田浩幸（hiroyuki_onda@sbfoods.co.jp）

講演番号：3A04p11
講演日時：3 月 19 日 16:50～ A 校舎 04 会場

セシウムおよびストロンチウムによる内部被曝を軽減化する食品素材・成分の探索
Effect of food materials and components reducing the internal exposure by cesium and strontium

○上原 祐也[1]、石塚 加奈[2]、島村 裕子[1,2]、保田 倫子[1,2]、下位 香代子[1,2]、増田 修一[1,2]([1]静岡県大院薬食、[2]静岡県大食栄)
○Yuya UEHARA[1], Kana ISHIZUKA[2], Yuko SHIMAMURA[1,2], Michiko YASUDA[1,2], Kayoko SHIMOI[1,2], Shuichi MASUDA[1,2] ([1]Pharm. Nutr. Sci., Univ. Shizuoka, [2]Dept. of Food and Nutr. Sci., Univ. Shizuoka)

【背景】2011 年に起こった福島第一原発の事故により、多くの放射性物質が環境中に放出されたことから、放射線被曝によるヒトへの生体影響が危惧されている。特に、放射性物質の中でも $^{137}Cs$ と $^{90}Sr$ は半減期が長いため、これら放射性物質に汚染された食品の摂取により、長期的な内部被曝が起こることが考えられる。したがって、放射性物質である $^{137}Cs$ や $^{90}Sr$ の体内への吸収を抑制することや、体内に吸収された場合に迅速に排泄することが内部被曝を防ぐために重要である。本研究では、Cs または Sr の吸収を抑制及び排泄を促進する食品素材や成分を探索することを目的として実験を行った。
【実験】本実験には安定同位体である CsCl や $SrCl_2$ を用いた。(1) in vitro 試験において、食物繊維等成分(アルギン酸ナトリウム(ALA-Na)、アルギン酸カルシウム(ALA-Ca)、ラミナラン、メチルセルロース(MC)、カルボキシメチルセルロースナトリウム(CMC-Na)、コンドロイチン硫酸(ChS))やそれらを含む食品(昆布、モロヘイヤ、シイタケ、ナメコ)を水に溶解または懸濁し、CsCl または $SrCl_2$ 水溶液を加えて 30 分間放置した。遠心式限外ろ過(MW：3000, 15000×g, 20 min, 37℃)を行い、ろ液中の Cs 及び Sr 濃度を ICP-MS を用いて測定し、各試料の Cs 及び Sr との吸着性を求めた。(2) (1)において吸着性が確認できた試料を、ICR マウス(5 週齢、雄)に経口投与後、直ちに CsCl または $SrCl_2$ 水溶液を単回経口投与し、24 時間後に解剖を行った。Cs 投与群については、大腿筋、ふくらはぎを、Sr 投与群については、大腿骨を採取した。硝酸を用いて各臓器を酸分解した後、ICP-MS で Cs 及び Sr 量を測定した。(3) Cs の排泄促進効果を評価するために、ICR マウス(5 週齢、雄)に CsCl 水溶液を経口投与した後、利尿作用を示す試料(コーヒー、緑茶、カフェイン、テオブロミン、テオフィリン)や同族元素であるカリウム(KCl)を 3 日間経口投与した。その間、CsCl 溶液投与後 24 時間間隔で採尿を行い、採取した尿は、硝酸を用いて酸分解した後、ICP-MS で Cs 量を測定した。
【結果・考察】(1) in vitro 試験において、ALA-Na、ChS、CMC-Na、MC が Cs と、また Sr においては、ALA-Na、ChS、CMC-Na、MC、ALA-Ca、昆布、モロヘイヤ、ラミナランが吸着性を示した。(2) ALA-Ca の投与により、筋肉中の Cs 濃度の減少が確認され、一方、ALA-Ca、ラミナラン、コンブの投与により、大腿骨中の Sr 濃度が減少したことから、これら試料の Cs および Sr に対する吸収抑制効果が確認できた。(3) コーヒー、テオフィリンおよび KCl を投与することで、尿中の Cs 量が有意に増加したことから、これら試料の Cs 排泄促進効果が確認できた。以上の結果より、これら食品素材や成分が、Cs や Sr による内部被曝を防ぐ有用なツールとなることが明らかとなった。

cesium, strontium, internal exposure

講演番号：3A04p12
講演日時：3 月 19 日 17:05～ A 校舎 04 会場

# 微生物の分解活性を利用したメラノイジンの部分構造の解析

# Partial structural analysis of melanoidins using microbial degradation activity

○油井 拓哉[1]、島村 裕子[1]、本間 清一[2]、増田 修一[1]([1]静岡県大食品栄養科学、[2]お茶大食物栄養)
○Takuya YUI[1], Yuko SHIMAMURA[1], Seiichi HONMA[2], Shuichi MASUDA[1] ([1]Sch. of Food and Nutr. Sci., Univ. Shizuoka, [2]Sch. of Nutr. and Food Sci., Ochanomizu Univ.)

【目的】メラノイジンは食品加工や貯蔵過程におけるメイラード反応によって生成する褐色ポリマーであり、主にコーヒー、味噌、醤油等の食品中に含まれている。メラノイジンには、抗酸化作用等の様々な生理活性があり、加齢の抑制や生活習慣病の予防に役立つことが期待されている。しかし、メラノイジンは、高分子化合物で、その化学構造が未解明であることから、これら機能性の発現機構の解明には至っていない。高分子化合物であるメラノイジンの構造解析の手法として、低分子化した断片を解析する方法が挙げられるが、強酸・強アルカリによる加水分解や酸化・還元分解では、元の化学構造が失われる可能性がある。そこで本研究では、メラノイジン分解活性を有する微生物を探索し、温和な反応条件下で分解を行い、メラノイジンの部分構造情報を得る技術の確立を目的とした。
【方法】沖縄県の宮古島および与那国島の土壌から分離した菌株を用いて、グルコースとグリシンから調製した非透析性モデル系メラノイジンの脱色能（波長 500 nm）を指標に、メラノイジン分解活性を有する微生物をスクリーニングした。メラノイジンの脱色能を有した分離株は、16S rDNA 配列により、その菌種を同定した。分離株の性状を明らかにするために、各種条件（培養温度; 30～50°C、pH; 4.0～8.0、NaCl 濃度; 5.0～15.0%）で調製した GYP 培地中での濁度（O.D 660 nm）を測定した。また、分離株の至適培養条件下におけるメラノイジン分解能について、モデル系メラノイジンを終濃度 0.1%で添加した GYP 培地にて 1 週間、静置培養した後の脱色能を吸光度で評価し、その脱色率を算出した。さらに、培養後の上清について、ゲル濾過カラムを用いた HPLC-DAD による解析を行い、メラノイジン分解の有無を評価した。
【結果・考察】グルコースとグリシンから調製した非透析性モデル系メラノイジンの脱色能を指標にメラノイジン分解活性を有する微生物のスクリーニングを行ったところ、有望な微生物 5 菌株を見出した。16S rDNA 配列の解析結果より、これら分離株を同定した。いずれの分離株においても、至適温度は 30°C、至適 pH は 8.0 であり、至適培養条件下での 1 週間の培養により、最大脱色率 33%を示した。また、5 株中 1 菌株においては、NaCl 濃度 8.5%の条件下でも生育可能であった。モデル系メラノイジン脱色前後の HPLC-DAD 解析の結果、分子量 10,000 以上のピーク面積が減少し、低分子画分に新たなピークが検出された。これらの結果より、これら微生物分解の主な作用は、発色団の官能基の変化ではなく、高分子の解重合である可能性が示唆された。

Melanoidin, Maillard reaction, bacteria

講演番号：3A04p13
講演日時：3 月 19 日 17:20～ A 校舎 04 会場

# グリセルアルデヒド由来新奇架橋型 AGEs の同定
# Identification of Novel Glycation Crosslinks Derived from Glyceraldehyde

○藤本 汐莉[1]、臼井 照幸[2]、早瀬 文孝[1]、渡辺 寛人[1]([1]明治大、[2]女子栄養大)
○Shiori FUJIMOTO[1], Teruyuki USUI[2], Fumitaka HAYASE[1], Hirohito WATANABE[1] ([1]Meiji Univ., [2]Kagawa Nutrition Univ.)

【目的】糖尿病患者の体内においてはメイラード反応が亢進しており、さまざまな組織に糖化反応後期段階生成物（AGEs）が蓄積して腎症、網膜症などさまざまな合併症発症に関与することが知られている。とくにグルコースの自動酸化や解糖系のグリセルアルデヒド-3-リン酸から生じるグリセルアルデヒド由来の AGEs は強い生理作用を有することから糖尿病合併症との関連が示唆されているが、その構造および生成経路については不明な点が多い。われわれはこれまでにグリセルアルデヒド由来 AGEs の構造を数種同定してきたが、本研究ではタンパク質の Lys 残基と Arg 残基と架橋する AGE 構造について解析を行った。

【方法】Lys のアナログとしてブチルアミン（25mM）、Arg のアナログとしてメチルグアニジン（25mM）を用い、これらとグリセルアルデヒド(50mM)とを DETAPAC(5.5mM)含有 200mM リン酸バッファー(pH7.4)中で 37℃、24 時間反応させた。反応溶液を固相抽出（Sep-Pak C18）および逆相 HPLC（Inertsil ODS-4）に供し、目的の AGE 構造を精製して、その構造を LC-ESI-QTOF-MS および NMR により解析した。

【結果】反応溶液を固相抽出にて粗分画し、逆相 HPLC により分析したところ、ブチルアミン、メチルグアニジンそれぞれ 1 分子と、グリセルアルデヒド 2 分子とが反応して形成される 2 種の新奇 AGEs（P5-1 および P5-2）を見出した。P5-1 および 2 を単離し、LC-ESI-QTOF-MS 分析に供することにより、これらの組成式がともに $C_{12}H_{22}N_4O_2$ であることを示した。

NMR による構造解析により、P5-1 および 2 はいずれもグリセルアルデヒド 2 分子がブチルアミンとメチルグアニジンを架橋してイミダゾピペリジン構造を形成したものであることが明らかとなった。またこれらはプロトン互変異性の関係にあることが示唆された。さらに P5-1 および P5-2 と同じ骨格の構造は、Lys、Arg とグリセルアルデヒドの反応によっても形成されることが明らかとなった。

P5-1 および P5-2 は Lys 残基側鎖と Arg 残基側鎖を架橋した構造の AGEs であることから、その形成は生体タンパク質の変性や重合に大きく寄与するものと推定される。本研究はグリセルアルデヒドが関与するメイラード反応によって形成されるタンパク質重合機構の一端を明らかにしたものであると考えられる。

advanced glycation end products, glyceraldehyde, post-translational modification

発表責任者：渡辺 寛人（hwata@meiji.ac.jp）

講演番号：3A04p14
講演日時：3 月 19 日 17:35～ A 校舎 04 会場

加熱処理が小麦アレルゲンの消化性に与える影響
Degradation of wheat antigen by heating
○友竹 浩之、岩瀬 彩香（飯田女子短大）
○Hiroyuki Tomotake, Ayaka Iwase (Iida Women's junior college)

【目的】　小麦のアレルゲンはグリアジン、グルテニン、α-アミラーゼインヒビター、トリプトシンインヒビター、ペルオキシダーゼなどがあるが、比較的分子が小さく、加熱処理や消化酵素に対する抵抗性が高い。そのため、調理のような短時間で低い温度では、小麦アレルギー児が摂取することが可能なまでにアレルゲンを低減化することは難しいと考えられている。
本研究では、小麦タンパク質を粉のままオーブン加熱またはオートクレーブ加熱し、アレルゲンタンパク質の消化抵抗性をさらに強め、吸収が阻害される条件を検討することを目的とする。

【方法】　小麦タンパク質は市販の製パン用グルテンを用いた。グルテンをアルミホイルの上に平らに広げて包んだ後、オーブン（200℃、20 分）またはオートクレーブ加熱した（121℃、20 分）。
　加熱処理後または未処理のグルテンを緩衝液に懸濁し、ペプシンおよびパンクレアチンを作用させ、反応液中のアレルゲンタンパク質を継時的に観察した。反応液は尿素と SDS を含む緩衝液中で溶解した（60℃、1 時間）後、SDS-PAGE 用サンプル処理液を加え（1:1）、15%ポリアクリルアミドゲルを用いて、電気泳動を行った。
SD 系雄ラットを使用し、小麦グルテンをタンパク質源として飼料を作製した。未処理、オーブン加熱またはオートクレーブ加熱したグルテンをタンパク質源としてラットを飼育した（グルテン群、オーブン加熱群、オートクレーブ加熱群）。実験期間は 7 日間とし、最後の 2 日間の糞を採取した。糞中の窒素含量はケルダール法で分析した。

【結果と考察】グルテンをオーブンまたはオートクレーブで加熱処理したところ、未処理のものに比べ、小麦主要アレルゲンであるグリアジンに相当するバンドが弱くなったが、これは、変性による溶解性の低下が影響していると考えられた。ラットの実験では、加熱処理したグルテン群の糞重量と窒素排せつ量が増加していた。また盲腸の肥大が見られ、消化が悪くなっている可能性が示唆された。

wheat, heat treatment, antigen

発表責任者：友竹浩之（tomotake@iidawjc.ac.jp）

講演番号：3A04p15
講演日時：3 月 19 日 17:50～ A 校舎 04 会場

シカ肉の調理・加工によるイミダゾールジペプチドの変化
Changes of imidazole dipeptides in venison during food processing
○近藤（比江森） 美樹[1]、植田 玲奈[1]、長尾 久美子[2] ([1]徳島文理大人間生活、[2]徳島文理大短大)
○Miki Hiemori-Kondo[1], Rena Ueta[1], Kumiko Nagao[2] ([1]Tokushima Bunri Univ., [2]Tokushima Bunri Jr. Coll.)

【目的】 近年、全国でシカやイノシシなどの有害野獣問題が深刻化している。なかでもシカ肉は、牛肉や豚肉に比べて低脂肪、鉄分やビタミン B 群が豊富であり、栄養面で高い価値を有する食材である。さらに、抗酸化性や抗疲労効果を有する機能性ペプチドとして、アンセリンやカルノシンなどのイミダゾールジペプチドを含むことが知られている。しかし、「臭い」や「硬さ」の食味の問題が挙げられる。これまで、野獣対策において捕獲されるシカを食肉として有効活用するために、添加物による食味改善効果を検討してきた。本研究では、シカ肉利用食品の高付加価値化を目的に、調理・加工によるイミダゾールジペプチドの挙動を解析した。
【方法】 試料のシカ肉は、「阿波地美栄処理衛生管理ガイドライン」に沿って、木沢シカ肉等処理加工施設において解体された野生シカ、メス、モモ肉の冷凍品とした。まず、加熱温度がイミダゾールジペプチドに及ぼす影響を検討した。成形した肉を真空包装し、65℃、75℃、80℃、85℃、90℃、95℃、100℃の熱湯中で 10 分間加熱した。中心温度、クッキングロス、破断応力を測定後、加熱肉およびドリップからイミダゾールジペプチドを抽出し、HPLC によりアンセリン、カルノシン、およびバレニンを分離・定量した。対照として、非加熱肉も分析した。次いで、シカ肉を軟化作用や消臭効果が期待できる各種調味料および食材により 4℃で一晩浸漬後、加熱した試料についてクッキングロス、破断応力、SDS-PAGE におけるタンパク質の分解パターン、官能検査によって添加物の食味改善効果を比較した。さらに、これら調理済みシカ肉のイミダゾールジペプチドを定量した。
【結果および考察】 非加熱・未処理のシカモモ肉のイミダゾールジペプチドは、アンセリンが多く、哺乳類ではウサギの組成と類似していた。加熱温度の上昇にしたがって、クッキングロスおよび破断強度が増加し、肉汁の流出量と硬さが上昇した。さらに、肉の加熱により流失した肉汁にイミダゾールジペプチドの存在を認め、総量はクッキングロスに比例して低下した。しかし、組成は変化しなかった。これらの結果から、シカ肉の調理・加工においては、軟化作用に加えて機能性成分の保持の観点でも、クッキングロスを抑制する加熱方法や添加物の利用が有効であることが示唆された。
本研究は、徳島文理大学「平成 27 年度 特色ある教育・研究（課題番号 YBU2015-1-1T）」の助成を受けて実施した。

venison, imidazole dipeptide

講演番号：3A04p16
講演日時：3 月 19 日 18:05～ A 校舎 04 会場

食品成分表の国際間比較研究－日米－
Comparative study on international food composition table-Japan and the U.S.A.-
○石本 祐子、竹崎 江里、甲斐 達男（西南女学院大）
○Yuko ISHIMOTO, Eri TAKEZAKI, Tatsuo KAI (Seinan Jo Univ.)

**【背景・目的】**

諸外国における食品成分表については、日本ではほとんど紹介されていないので、われわれは、G8 諸国をはじめとして各国の成分表の、構成、活用目的と方法、また、作成に至るまでの経緯などを研究している。今回は、米国の食品成分表を取り上げて、その特徴をより鮮明に理解できるよう日本食品標準成分表とさまざまな観点から比較検討した結果を報告する。

**【結果】**

「日本食品標準成分表 2015（七訂）」は、18 食品群 2,191 食品で構成されているのに対し、米国の食品成分表(SR)では、25 群 8,789 食品が収載されており、日本よりもかなり多い。米国では、特に「肉類」において種別に細分化されており 2,325 品目にのぼる。対して、日本の「肉類」の食品数は 291 品目であり、約 8 倍の違いがある。米国では、2006 年に「Ground Beef Calculator（牛ひき肉計算機）」が SR の web データベース上に公開された。そこでは、牛ひき肉の赤身に対する脂肪の割合を入力しさらに調理法を選択すると、調理後の成分値が表示されるようになっている。このことから、アメリカの食生活において肉類がいかに重要な位置を占めるかを食品成分表から窺い知ることができる。また、育児用調製粉乳を含む「Baby Food（離乳食）」が 367 品目もの数収載されている点や、「American Indian/Alaska Native Foods」が食品群として独立していることが特徴的であった。日本と比較して、収載食品は調理加工されているものが多く、栄養評価をする際に細かく選択対応が可能で、応用が容易であることが判った。食品の重量を把握する際、国際単位の「g」だけでなく、「tbsp（テーブルスプーン）あたり」や、「bar（本）あたり」などの単位でも栄養価を把握できることが特徴的であった。

**【考察】**

食品成分表は、私たちの健康づくりの施策を実行するための「基礎データ」として存在し、その傍らには、常に食生活指針や食事摂取基準などのガイドラインを共に置いて国民の健康増進に取り組んでいることは、日米間で変わりがなかった。食文化が多様化し国際化している現在、国際的に標準化された食品成分表、つまり、どの国でもフレキシブルに利用可能な国際食品成分表の必要性がいずれ生じるであろう。そのために、世界各国の食品成分表の特性を正確に把握するための調査研究を今後も推し進めたい。

food composition table, international, the U.S.A.

講演番号：3A05a02
講演日時：3 月 19 日 09:35～ A 校舎 05 会場

バイオフィルム破壊活性を有する食材の探索
Screening the biofilm eradication activities of foodstuffs
○塚谷 忠之、末永 光、川口 友彰、黒田 理恵子 (福工技セ・生食研)
○ Tadayuki TSUKATANI, Hikaru SUENAGA, Tomoaki KAWAGUCHI, Rieko KURODA (Fukuoka Industrial Technology Center)

【目的】
微生物が産生するバイオフィルムは、歯周病や皮膚創傷など感染症の大きな要因となっている。このため、抗バイオフィルム素材の探索が活発に行われている。しかし、マイクロプレートのウェル底にバイオフィルムを形成させて評価する従来の手法は、操作性、迅速性、再現性において問題があり、スクリーニング手法として適用が困難である。演者らは、水溶性テトラゾリウム塩を用いた微生物検出法と 96 ピン付きマイクロプレート蓋へのバイオフィルム形成法を組み合わせることにより、ハイスループットなバイオフィルム破壊活性スクリーニング法を開発してきた。そこで、本スクリーニング法を様々な食材の抽出液へ適用し、バイオフィルム破壊活性を有する食材の探索を試みた。
【方法】
(1)検出試薬：水溶性テトラゾリウム塩WST-8と電子メディエータ2-methyl-1,4-naphthoquinone(NQ)を10%DMSO水溶液に溶解し、検出試薬とした。
(2)バイオフィルム形成法：96ウェルマイクロプレートへ最適な培地で調製した微生物懸濁液を分注し、これに96ピン付きマイクロプレート蓋を被せて35～37℃で一定時間インキュベーションし、バイオフィルムを形成させた。
(3)バイオフィルム破壊活性のスクリーニング：96ウェルマイクロプレートへミュラーヒントンブロス(MHB)培地180μl及び試料20μlを分注し、バイオフィルムを形成させた96ピン付きマイクロプレート蓋を被せ、20時間インキュベーションした。次に、96ピン付きマイクロプレート蓋を滅菌生理食塩水で3回洗浄後、検出試薬含有MHB培地へ移し、一定時間反応させた。反応後、マイクロプレートリーダを用いて吸光度測定(460nm)を行い、阻害率90%以上をバイオフィルム破壊活性ありと判定した。
【結果】
食材、食品、食品副産物などのエタノール抽出液 658 種類、水抽出液 653 種類を本スクリーニング法へ適用し、黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* 及びう蝕性菌 *Streptococcus mutans* のバイオフィルムに対する破壊活性を探索したところ、*S. aureus*、*S. mutans* のバイオフィルムに対しては、それぞれ 6、7 素材が 90%以上の破壊活性を示した。選抜された素材の中で、*S. aureus* 及び *S. mutans* いずれのバイオフィルムに対しても 90%以上の破壊活性を示したのは、ローズマリー(葉)、ウド(皮)、メースのエタノール抽出液であった。

biofilm, screening, foodstuffs

講演番号：3A05a03
講演日時：3 月 19 日 09:50～ A 校舎 05 会場

# 食中添加物によるサルモネラのバイオフィルム形成阻害機構の解明

# Study on mechanism for inhibition of biofilm formation of Salmonella by food additive

○立石 実麗[1]、Md Tariqul Islam[3]、小椋 彩[1]、森永 憲子[1]、益田 時光[2]、本城 賢一[2]、宮本 敬久[2]
([1]九州大学大学院 生物資源環境科学府 生命機能科学専攻 食料化学工学教育コース 食品衛生化学研究室、[2]九州大学大学院 農学研究院 生命機能科学部門 食料化学工学講座 食品衛生化学研究室、[3]Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, University of Rajshahi)
○Mirai TATEISHI[1], Tariqul Islam Md[3], Aya Ogura[1], Noriko Morinaga[1], Tokimitsu Masuda[2], Ken-ichi Honjo[2], Takahisa Miyamoto[2] ([1]Lab. of Lab. of Food Hygienic Chemistry, Graduate School Food Science & Biotechnology, Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Kyushu University, [2]Lab. of Food Hygienic Chemistry, Division of Food Science & Biotechnology, Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Kyushu University, [3]Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, University of Rajshahi)

【背景】近年、カット野菜などの生食用野菜の消費量が増えている。しかし加熱殺菌を施せない生食用野菜に食中毒細菌が付着してバイオフィルムを形成すると、通常の洗浄殺菌だけでは除去できず、食中毒発生のリスクが懸念される。本研究室では、安全性が確認されている食品添加物によるバイオフィルム形成阻害作用について検討してきた。
【目的】これまでの研究において、種々の食品添加物等のバイオフィルム形成阻害について調べた結果、0.001%ポリリジン（PL）と 0.25%乳清タンパク質（MSP）の併用が、多くの菌に対して強いバイオフィルム形成阻害効果を示した。そこで本研究では、PL と MSP の併用によるバイオフィルム形成阻害機構の解明を目的としている。

【方法と結果】PL および MSP 処理の遺伝子転写への影響を調べるため、DNA マイクロアレイを用いて、*Salmonella* Typhimurium (ST)の遺伝子転写量を、食品添加物存在下および非存在下で比較した。その結果、転写量が 4 倍以上変化した遺伝子数は、PL 単独の存在下では 610 個、MSP 単独の存在下では 105 個、PL と MSP の併用では 123 個だった。その中でも変化量も大きく、バイオフィルム形成に関連する遺伝子について、その転写量の変化を RT-qPCR 法を用いて確認した。

マイクロアレイの結果と同様に、PL 単独では、物質表面への付着に関わるカーリータンパク質に関する遺伝子の転写量が減少し、ストレス応答や親水性細胞外多糖産生に関する遺伝子の転写量が増加した。PL は塩基性アミノ酸で構成されるため正に帯電しており、負に帯電している細菌の表面に吸着すると考えられる。物理化学的作用に加え、PL が与えるストレスによるカーリータンパク質の発現抑制、また親水性細胞外多糖の生産促進など、細菌の付着力低減につながる遺伝子転写の変化は、PL のバイオフィルム形成阻害に重要と思われる。

一方、MSP 単独ではこれらの遺伝子転写量に影響を与えなかったため、MSP は物理化学的な作用で細菌のバイオフィルム形成を阻害していると考えられる。

PL と MSP の併用では、PL 単独の時と同様の遺伝子の転写量が変化したが、変化は小さかった。MSP 共存下では PL の遺伝子発現に対する影響が若干緩和されたことから、PL と MSP の併用によるバイオフィルム形成阻害効果には、PL と MSP の相互作用による 2 次的な効果も関与していると考えられる。

biofilm, inhibition, food additive

講演番号：3A05a04
講演日時：3 月 19 日 10:05～ A 校舎 05 会場

# Antibacterial Effect of Essential Oils, Modified Atmosphere Packaging, and their Combination against Microorganisms in Fresh Produce

○Jeong-Eun Hyun, Sun-Young Lee, Jae-Hyun Yoon, Jin-Ha Hwang, Yun-Sun Choi, Aerum Han (Chung-Ang University)

Recently, there has been an increasing consumer demands to replace chemically synthesized preservatives with natural preservatives for food preservation. This study was conducted to investigate the antibacterial effect of essential oils (EOs) and modified atmosphere packaging (MAP) for improving the quality and safety of fresh produce during storage. The antibacterial effect of various EOs in oil or vapor phase was evaluated against pathogenic and spoilage bacteria isolated from fresh produce. Cell damages on bacteria by EOs were measured using the fluorescent dye propidium iodide (PI). Moreover, combined effects of EOs and MAP were evaluated for reducing levels of total mesophilic microorganisms on fresh produce. Among EOs treated, thyme-1, thyme-2, and tea tree-2 oils demonstrated the strongest antibacterial effects against 18 strains of pathogen except for *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. When vapor phases of oils were tested, thyme-1, oregano-1, lemongrass-1, and lemongrass-2 oils showed strong inhibitory effects against pathogens. As a result of PI values, clove bud, cinnamon-2, and oregano-2 resulted in significant levels of membrane damage. Moreover, combination of lemongrass-2 oil in vapors phase and MAP showed that complete inactivation of total mesophilic bacteria in cabbage by < 1.0 $\log_{10}$ CFU/g after 14 days of storage at 4±2ºC. However, these treatments were affected on visual quality of cabbage during storage. Therefore, MAP using $CO_2$ gas was tested for various types of fresh produce, and then MAP application would may be limited for certain types of fresh produce because of quality deterioration. These results could provide useful information for developing alternative preservation method to improve the freshness and shelf-life of fresh produce.

fresh produce, essential oil, modified atmosphere packaging

発表責任者：Sun-Young Lee（nina6026@cau.ac.kr）

講演番号：3A05a05
講演日時：3 月 19 日 10:20～ A 校舎 05 会場

# 食品工業における様々な環境負荷を低減するイオン半導体および関連技術の開発と応用

# Development and Applications of the Ionic Semiconductor and Related Technologies for Reducing Various Environmental Loading in Food Industry

○田村 健治（首都大・産技高専品川）
○Kenji Tamura (TMCIT)

イオン半導体は、特許取得技術を駆使して製造されるランタノイド系酸化物を添加した高分子半導体である。様々な環境負荷が小さい環境適合型の装置である本半導体の特徴は、消費電力が著しく小さく、また人畜無害で取扱も安全・容易であることなどが挙げられる。本半導体の主たる機能は、各種溶媒あるいは雰囲気に対して、①非常に強力な還元作用（すなわち抗酸化作用）を発現すること、また同時に②粘度や表面張力などの流体物性が低下される現象（流体物質の有効分子量低下が強く示唆される現象）を伴うことの２点である。

本半導体あるいは関連技術を様々な分野・領域に応用して構築した装置・システムなどにおいて、顕著な環境負荷低減効果が認められている。本半導体および関連技術を導入することにより発現される新規活性種は、(1)各種二次電池用バッテリー活性強化剤、(2)再生二次電池を基盤とする夜間電力あるいは再生可能エネルギーを指向した電力エネルギー貯蔵システム、(3)冷媒などの循環効率向上に伴う省エネルギー型熱交換システム、(4)内燃機関における燃焼効率の向上に起因する燃費向上効果および排気ガス清澄効果を発現する燃油あるいはエンジンオイル向け添加剤、(5)食品揚げ加工工程における食用油劣化防止システム、(6)食品の鮮度保持および選択的な熟成促進を実現する冷凍・解凍システムなどの開発に応用・利用され、それぞれ実用段階まで開発されつつある。上述した適用事例のうち、新規活性種由来の強力な抗酸化作用（酸化還元電位の低下）に基づく装置・システムは、(1)(2)(6)である。また、新規活性種の発現に伴う流体物性の変化（粘度あるいは表面張力の低下）に基づく装置・システムは(3)(4)である。さらに、これらの両者を活用する装置・システムは(5)である。

強力な抗酸化作用を発現し、流体物性を変化させる本半導体由来の新規活性種は、その溶液構造などについては現在までのところ未確定（様々な知見から溶媒和電子型の類縁構造を有するものと推定）であるが、その安全性、存在寿命（極性溶媒については長期貯蔵・流通可能）、各種物性値などに関する試験分析データなどは既に取得済みである。従来法による溶媒和電子の調製方法は、放射線照射など危険・高エネルギー消費を伴う手法が多く、存在寿命が非常に短い特性がある。これに対して、本半導体由来の新規活性種は、非常に安全・簡便なで低エネルギー消費な手法によって調製され、またその存在寿命についても非常に長い特性を有する点が大きく異なっている。

本報では食品加工あるいは食品工業における適用事例の概要について製造技術的見地より概説し、得られた試験分析結果および実践的なフィールドデータについても併せて報告する。

the Ionic Semiconductor, antioxidative effect, low environmental loading type technology

発表責任者：田村　健治（ktamura@metro-cit.ac.jp）

講演番号：3A05a06
講演日時：3 月 19 日 10:45～ A 校舎 05 会場

# アドミッタンス解析に基づく水晶振動子マイクロバランス法によるステンレス鋼表面上のタンパク質付着層形成過程に関する研究

# Monitoring of protein layer formation on stainless steel surface by the quartz crystal microbalance based on admittance analysis

○萩原 知明、ナッタウッド ボースリー、柴田 真理朗、崎山 高明（東京海洋大食品）
○Tomoaki HAGIWARA, Phosri NATTAWUT, Mario SHIBATA, Takaharu SAKIYAMA (Tokyo Univ. Marine Sci. & Technol.)

【緒言】

食品の製造過程では、製造機器・設備の表面にタンパク質由来の汚れがしばしば付着する。こうした汚れは、製品を劣化させる微生物の潜在的な栄養源となり、機器・設備の性能低下および寿命短縮も引き起こす。これらの問題が起こらないようにするため、洗浄は欠かせない操作である。一方で、洗浄は多量の水、洗剤、エネルギーを使用する過程であり、地球環境問題の観点から、これらの使用量の削減が求められている。

本研究では、水、洗剤、エネルギーの使用量を削減するための基礎的な知見を得るため、アドミッタンス解析に基づく水晶振動子マイクロバランス法(QCM-A)を用いて、ステンレス鋼表面上のタンパク質付着層形成過程を詳細に調べた。

【方法】

タンパク質としてウシ血清アルブミン(BSA)、QCM-A 装置は AFFINIX QN Pro（㈱アルバック）を用いた。ステンレス鋼でコーティングされた電極表面を有する測定用センサーセルに 50mM HEPES(pH7.0)を 400μL 注入し、25℃3 時間にわたってセンサーセルの安定化を行った後、BSA 溶液（溶媒 50mM HEPES(pH7.0)）を注入し（最終 BSA 濃度 0.0498～ 6.98mg/mL)、ステンレス鋼表面上の付着層の重量変化(Δ$m$)、付着層およびセンサー内の粘性成分に由来するエネルギー損失を反映した $D$ 値の変化(Δ$D$）を 2 時間測定した。測定はすべて 25℃で行った。

【結果および考察】

BSA 溶液を注入した直後から、Δ$m$ は時間とともに増加し、2 時間後も一定値に収束せず増加し続けた。Δ$D$ も同様に 2 時間後も変化し続けた。異なる BSA 濃度条件下でのΔ$D$ のΔ$m$ に対する変化から、BSA 濃度が高い時には、吸着した BSA 分子の配置が変化することにより、BSA 付着層の緻密化が生じていることが示唆された。BSA 溶液を注入して 2 時間後のΔ$m$ の BSA 濃度依存性は、見かけ上ラングミュアの吸着等温線の式で良好に近似できた。しかしながら、Δ$m$ の時間変化は、いずれの BSA 濃度でもラングミュア吸着モデルの予測と大きく異なった。拡張指数関数を含む式を用いることで、Δ$m$ の時間変化を良好に記述可能であった。

QCM-A, cleaning, protein adsorption

発表責任者：萩原　知明（tomoaki@kaiyodai.ac.jp）

講演番号：3A05a07
講演日時：3 月 19 日 11:00～ A 校舎 05 会場

# Effects of different freezing and thawing methods on quality preservation of *Pleurotus eryngii*

○ TONG LI[1], Jo-Won Lee[1], Yena Heo[1], MinJoo Kim[1], Jongkee Kim[2], BoKyung Moon[1]
([1]Department of Food and Nutrition, Chung-ang University, [2]Department of Integrative Plant Science, Chung-Ang University)

Individually quick-frozen (IQF) method is used to produce high quality frozen food by freezing individual piece of food separately. In this study, we aimed to investigate the effects of freezing and thawing conditions on the quality of mushrooms (*Pleurotus eryngii*). Diced *Pleurotue eryngii* mushrooms and mini *Pleurotue eryngii* mushrooms were used for analysis. Samples were frozen by natural freezing (NF, –20 °C) and individually quick-frozen (IQF, –62.5 °C and speed 8.23 m/s) methods. Frozen mushrooms were thawed to a central temperature of 4 °C using either flowing water thawing (FT, 4 °C), microwave thawing (MT, 620 W) or natural air convection thawing (NT, 20 ± 5 °C). Quality characteristics of mushrooms were evaluated by thawing loss, texture, water holding capacity, and color. MT showed the most rapid thawing time followed by FT, and NT in all samples. A combination of IQF and MT showed the lowest thawing loss among tested samples. IQF samples showed significantly higher water holding capacity than NF samples. Water holding capacity of diced mushrooms after thawing was lower than mini mushrooms and it might be caused by cell damage during processing. Based on the results of this study, MT combined with IQF was chosen as the best combination to minimize the quality changes of frozen *Pleurotus eryngii* in all shapes.

Individually quick-frozen (IQF), Mushroom, Thawing

発表責任者：LI TONG（jensen1986@naver.com）

講演番号：3A05a08
講演日時：3 月 19 日 11:15～ A 校舎 05 会場

Effect of different cooking conditions on biogenic amines in *Doenjang*

○Yena Heo, So Hee Yoon, Ji Hyun Park, Xueru Hai, Bokyung Moon (Department of Food and Nutrition, Chung -Ang University)

Biogenic amines are formed by microorganisms during fermentation in plants and animals and considered hygienic indicators. Biogenic amines found in food are histamine, tryptamine, 2-phenylethylamine, putrescine, cadaverine, tyramine, spermidine, and spermine. *Doenjang* is a traditional fermented food made of soybean and it is widely used in cooking of various foods in Korea. During fermentation, harmful substances such as biogenic amines could be produced in *Doenjang.* In our study, we monitored types and quantities of biogenic amines in commercial *Doenjang* and tried to investigate the effect of cooking conditions on the change in biogenic amines. Biogenic amines were determined using a high performance liquid chromatography-fluorescence detector (HPLC-FLD). The contents of biogenic amines in commercial *Doenjang* depended on the manufacturer, and ranged from none detected to 415.08 mg/kg. Putrescine and tryptamine were the most abundant biogenic amines in *Doenjang* samples and cadaverine was not detected in all commercial samples. For all cooking conditions, tryptamine, 2-phenylethylamine, puterescine, and tyramine were detected in *Doenjang,* and their contents decreased significantly after 10 minutes of baking. The contents of total biogenic amines in *Doenjang* soup did not change significantly by boiling. Therefore, baking, compared with boiling, was considered more effective in reducing biogenic amines in *Doenjang*.

biogenic amine, Doenjang, HPLC

発表責任者：Yena Heo（hyn2150@nate.com）

講演番号：3A05a09
講演日時：3 月 19 日 11:30～ A 校舎 05 会場

# 生鮮ウニの新規保存法検討に関する研究

# A new method to preserve fresh sea urchin

○北村 楓子、宮脇 長人、鈴木 徹（東京海洋大院）
○Fuko KITAMURA, Osato MIYAWAKI, Toru SUZUKI (Tokyo University of Marine Science and Technology)

【背景・目的】

生鮮ウニ身は鮮度低下が早く、保存性が低いため迅速な商品の流通が不可欠となり、高価格での流通が余儀なくされている。低価格で流通しているものは、ウニの形状を保つためにミョウバン処理、弱加熱が施されているが、前者は苦味を呈することもあり、生鮮ウニ本来の味とは言い難い。生鮮ウニの凍結保存についての研究はこれまで繰り返し行われていたが、身が溶け出してしまい、成功した事例はない。本研究では、ミョウバン処理を施さず、生鮮ウニ本来のおいしさを保持する新しい貯蔵法として凍結乾燥法 FD に着目し、FD―保管試験を行い、また復水後の復元性について誘電率による細胞損傷の計測や官能評価を中心に FD 法の実用性を検討した。

【方法・結果】

１つめに、研究室品川に未凍結で到着した岩手県洋野町産のキタムラサキウニの身を取り出したもの、及び、開口処理のみを行ったものを、長期および短期の２種類のプログラム下において凍結乾燥を行った。凍結乾燥後のサンプルを復水すると、身は溶け出さず、生状態に近かった。また、これらについて官能評価を行ったところ、同じく生状態に近似していることが裏つけられた。

２つめに、凍結乾燥処理を行った同ウニを復水し、インピーダンス測定を行い、Cole-Cole プロットで表したところ、大きな膜損傷が起こっていないと示唆される結果を得ることができた。

これら得られた結果を活用し、凍結乾燥処理をした生鮮ウニ身に関して生に近い復元性をもたらすメカニズムの解明、および長期保存化を目指してた条件設定開発を継続していく予定である。

sea urchin, freeze dry, electrical measurment

発表責任者：鈴木徹（toru@kaiyodai.ac.jp）

講演番号：3A05p01
講演日時：3 月 19 日 14:00～ A 校舎 05 会場

ナルトビエイの粕漬けに関する研究
Study on Method for Producint a Longheaded Eagle Ray pickled in sake lees
○福田 翼、祇園 雄大、辰野 竜平、古下 学（水産機構水大校）
○Tsubasa FUKUDA, Yudai GION, Ryohei TATSUNO, Manabu FURUSHITA (National Fisheries Univ.)

【目的】ナルトビエイ（*Aetobatus narutobiei*）は，二枚貝などの水産資源を捕食する．近年，このナルトビエイによる食害が深刻化しており駆除が行われている．一方，駆除されたナルトビエイは，保存中に含有する尿素の分解によりアンモニアが発生するため，その利用が困難であり大半が焼却処分されている．日本の伝統的な粕漬けは，熟成した酒粕（踏込粕）を用いて製造される．踏込粕に含まれるエタノールは一般生菌数を低減させる上，芳香性の改善を期待できる．本研究では，エイの新たな加工法の構築を目的に，酒粕を用いたナルトビエイの粕漬け製造を試みた
【方法】ナルトビエイは，市販の冷凍品を用いた．まず，流水解凍を行い，水道水を用いて魚肉表面を洗浄した．水分をよく拭き取り，20%濃度の食塩を添加し塩蔵した（4 ˚C・72 時間）．水道水を用いて塩抜きを 3 時間行い，水分をよく拭き取った．滅菌ガーゼに包み，酒粕に漬け込んだ．踏込粕は，無添加のものを業者より入手したものを用いた．酒粕には砂糖を添加し，砂糖添加濃度は 0，5，10，20%とした．滅菌済容器に酒粕 1,100 g，魚肉 700 g を入れ密封し，20 ˚C で保存した．
【結果】一般生菌数の経時変化を調査した結果，粕漬けを行った場合，時間経過と共に減少した．保存 0 週間目は $1.0\times10^5$ CFU/g となったのに対し，保存 1 ヶ月目において，砂糖添加割合 0%では $1.1\times10^5$ CFU/g，20%では $1.1\times10^4$ CFU/g となった．したがって，砂糖添加割合が高い程，増殖抑制効果が高い事が示唆された．一方，粕漬け未処理の場合，$2.0\times10^7$ CFU/g となり，腐敗レベルである $1.0\times10^6$ CFU/g に到達していた．乳酸菌数および酵母数においては，いずれの場合も検出限界以下（$1.0\times10^1$ CFU/g）となった．各砂糖添加割合における官能評価を行った結果，粕漬けによりアンモニア臭が低減されことが示唆された．また，砂糖添加によりアルコール臭が感じられ，最もアルコール臭が強かったのは砂糖添加割合が 10%の時であった．色差を調査した結果，粕漬けにより暗色化した．砂糖添加割合が高い程，暗色化傾向が見られた．現在，物理的特性ならびに化学的特性分析を実施している．

traditional food, fermentation, seafood product

発表責任者：福田　翼（tsubasa@fish-u.ac.jp）

講演番号：3A05p02
講演日時：3 月 19 日 14:15～ A 校舎 05 会場

# 乾燥熟成牛肉（ドライエイジングビーフ）中の香気成分の生成に与える微生物（カビ）の影響

# Effects of microbes on formation of volatile compounds in dry-aging beef

○山田 朱里[1]、市川 宗一郎[1]、宮嶋 浩輝[1]、跡部 美樹雄[2,3]、村上 周一郎[1,3]([1]明治大農、[2]（株）フードイズム、[3]（株）ミートエポック)
○ Akari YAMADA[1], Soichiro ICHIKAWA[1], Koki MIYAJIMA[1], Mikio ATOBE[2,3], Shuichiro MURAKAMI[1,3] ([1]Meiji Univ., [2]FOODISM CO.,LTD, [3]MEAT EPOCH CO.,LTD)

〈目的・背景〉

近年人気のある熟成牛肉（ドライエイジングビーフ）の特徴は、熟成させることによる肉質の軟化、旨味の増加、脂の融点の低下、香りの向上などであり、それらの特徴は一般に流通している肉に勝っているといわれている。これらの特徴の中で、熟成により生じる香り（熟成香）に関する研究はあまり知られていない。また、熟成肉の製造過程中にカビが表面を覆うことで腐敗を防ぎ、より美味しい熟成肉が製造されるといわれている。そこで本研究では、微生物が関与することで生じる熟成肉の特徴の中で、特に香り成分に注目して分析し、熟成香の形成における微生物の影響を明らかにすることを目的とした。

〈方法と結果〉

熟成肉の製造において優占種であるカビの一種 *Helicostylum* sp. JW-1 株の胞子をつけた布である「熟成シート」を巻いた肉（熟成シートサンプル）と胞子をつけていないシートを巻いた肉（コントロール）を用意した。試料としては、赤身である和牛の外モモ肉（シキンボ）を用いた。それらを 4℃、湿度 80～90%の条件下で放置し、0、10、20、30 日目でサンプリングした試料を－80℃で一時保存した。香り成分は 3 時間、40℃の条件の下で固相マイクロ抽出（SPME）法を用いて抽出し、GC-MS で分析した。その結果、これまでの加熱した牛肉の香り成分の分析において検出されているアルカン類、アルコール類、アルデヒド類、ケトン類が検出されたが、今回用いた非加熱条件下ではラクトン類は検出されなかった。また、コントロールでは一般的に樟脳臭[1)]と言われている cyclohexanol が熟成の進行につれて顕著に増加したのに対し、熟成シートサンプルではその増加が抑制されていた。一方、熟成シートサンプルにおいて 2-heptanone の増加が見られ、これが熟成肉特有の果実様の香り[2)]に寄与していると考えられた。以上のことから、熟成肉特有の香りの形成には微生物の関与が重要であることが示唆された。

次に部位による差異を検証するために、脂身が多く香りが強いバラ肉（ボウバラ）を使い熟成シートを用いた同条件で熟成させたところ、シキンボの場合と同様に cyclohexanol の増加が抑えられ、2-heptanone が増加する傾向が見られた。また、シキンボの熟成過程では見られなかった花様の香りを持つ benzeneacetaldehyde、phenylethylalcohol の増加が観察された。

1）大木ら　化学大辞典 第一版、p. 958、株式会社　東京化学同人
2）田口ら　日本女子大学紀要　家政学部、第 60 号、p. 23、2013 年

aging beef, meat flavor, solid-phase microextraction

発表責任者：村上 周一郎（smura@meiji.ac.jp）

講演番号：3A05p03
講演日時：3 月 19 日 14:30～ A 校舎 05 会場

「さつま砂糖漬け鯛」の製造法に関する研究
Study on Method for Producing a Red Sea Bream Ppreserved in Sugar
○内山 晃一、川野 純平、辰野 竜平、古下 学、前田 俊道、福田 翼（水産機構水大校）
○Koichi UCHIYAMA, Junpei KAWANO, Ryohei TATSUNO, Manabu FURUSHITA, Toshimichi MAEDA, Tsubasa FUKUDA (National Fisheries Univ.)

【目的】さつま砂糖漬け鯛は，江戸時代の料理集『鯛百珍料理秘密箱』（1785 年）に記載されている薩摩地方（鹿児島県）の保存食である．さつま砂糖漬け鯛は，「①三年味噌による漬け込み」「②味噌漬けした鯛の砂糖への漬け込み」の 2 ステップにより製造される．さらに，文中には「(保存中は)風を通さなければ長期保存が可能である」と記されている．本記述は，さつま砂糖漬け鯛製造は発酵が寄与しているものと推測される．

本発表では，三年味噌の漬け込みの有無がさつま砂糖漬け鯛の保存性に及ぼす影響を調査したので報告する．

【方法】さつま砂糖漬け鯛は，「鯛百珍料理秘密箱」記載に則り製造した．まず，三枚におろしたマダイに食塩を 5%添加し，4°C で一昼夜干した．干したタイは 1 cm 程度にカットした後，滅菌ガーゼに包み，味噌に漬け込んだ（4°C・48 時間）．味噌漬けにしたマダイを滅菌ガラス容器に入れ，砂糖を添加した．砂糖添加割合はマダイ魚肉重量に対して 0，10，20，40%とした．容器を密封し，20°C で保存した．

【結果】一般生菌数の経時変化を調査した結果，三年味噌に漬け込んだ場合，時間経過と共に減少した．保存 0 ヶ月目は $8.8\times10^4$ CFU/g であったのに対し，保存 1 ヶ月目において，砂糖添加割合 0%では $3.2\times10^3$ CFU/g，40%では $2.7\times10^3$ CFU/g であった．一方，未処理（味噌への漬け込み無し）の場合，時間経過と共に増大した．保存 0 ヶ月目は $3.6\times10^4$ CFU/g であったのに対し，保存 1 ヶ月目において，砂糖添加割合 0%では $3.7\times10^8$ CFU/g，40%では $4.3\times10^7$ CFU/g であった．したがって，味噌漬けを行った場合、一般的な食品の腐敗レベル $10^6$ CFU/g 以下となる事が明らかとなった．酵母数の経時変化を調査した結果，三年味噌に漬け込んだ場合，時間経過と共に減少した．保存 0 ヶ月目は $1.0\times10^3$ CFU/g であったのに対し，保存 1 ヶ月目においてはいずれの砂糖添加割合においても検出限界以下であった．一方，未処理（味噌への漬け込み無し）の場合，時間経過と共に増大した．保存 0 ヶ月目は $7.1\times10^4$ CFU/g であったのに対し，保存 1 ヶ月目において，砂糖添加割合 0%では $4.6\times10^4$ CFU/g，40%では $2.8\times10^7$ CFU/g であった．乳酸菌数については，いずれの条件においても検出限界以下であった．各砂糖添加割合における官能評価を行った結果，砂糖添加によりアルコール臭が感じられた．最もアルコール臭が強かったのは砂糖添加割合が 10%の時であった．現在，物理的特性ならびに化学的特性分析を実施している．

traditional food, fermentation, seafood product

発表責任者：福田　翼（tsubasa@fish-u.ac.jp）

講演番号：3A05p04
講演日時：3 月 19 日 14:45～ A 校舎 05 会場

# 短波帯交流加熱による豆乳の殺菌

# Inactivation of microorganisms in soymilk by Radio Frequency heating

○植村 邦彦、高橋 千栄子（農研機構）
○Kunihiko UEMURA, Chieko TAKAHASHI (NARO)

【目的】豆乳および豆乳加工品の安全性および保存性を向上するためには、豆乳に含まれる可能性のある枯草菌芽胞等の殺菌が重要となってくる。本研究では、豆乳に連続的に短波帯の交流電界を印加することにより、従来加熱処理に比べて、短時間の加熱時間で豆乳を連続殺菌処理することを目指した。
【方法】市販の豆乳に枯草菌芽胞などの指標菌を添加したものを、テフロン皮膜した電極を介して、27MHs の短波帯交流を印加し、豆乳を短時間で所定の温度まで加熱し、1～2 秒間の温度保持後、直ちに冷却し、圧力調整しながら排出することに入り、豆乳の短波帯交流加熱殺菌処理を行った。電極被膜を含めた電極構造、印加電力、流量および電極通過直後の温度の各パラメーターが殺菌効果に与える影響について検討する。また、処理前後のタンパク質の熱変性の測定を行い、豆乳の熱変性を評価した。
【結果】豆乳に 27MHz の短波帯交流を印加したところ、電極出口温度が高くなるほど、殺菌効果が高くなった。ただし、温度が高くなるにつれ、電極内でタンパク質が滞留し、焦げが生じる状況が認められたため、電極構造の改良を行い、短波帯交流により連続的に豆乳を殺菌処理する条件を見出した。また、短波帯交流加熱処理は、従来加熱に比べて、タンパク質の熱変性を低減可能であることが分かった。

soymilk, inactivation, RF heating

発表責任者：植村邦彦（uemura@affrc.go.jp）

講演番号：3A05p05
講演日時：3 月 19 日 15:00～ A 校舎 05 会場

# 短時間吸水大豆における KTI と BBI の経時的な遺伝子発現変動と、プロテアーゼ阻害活性について
# Gene expression changes and intestinal protease inhibition activities of BBI and KTI in soybean after short-term imbibition

○田村 倫子、阿久澤 さゆり、村 清司（東農大・応生・健康）
○Tomoko TAMURA, Sayuri AKUZAWA, Kiyoshi MURA (Tokyo Univ. Agric.)

**【目的】**種子の代謝は吸水・発芽によりドラスティックに変動する。2012 年の大会では、大豆は吸水後 GABA や各種ビタミン、グルコースなどを順次増加し、食味を変化させることを発表した。大豆には KTI や BBI が含まれる。消化酵素を阻害する抗栄養素である一方で、抗がん作用遺伝子を刺激したり、がん転移を促す遺伝子を抑制したりする作用も知られている。今回は、吸水後の KTI と BBI をコードする遺伝子の発現変動と、大豆組織における局在、ならびにプロテアーゼ阻害作用を経時的に検討した。

**【方法】**25℃恒暗条件下で 8、16、24、32、40、48 時間吸水させた大豆（スズマル）を試料とした。
①KTI と BBI をコードする遺伝子の吸水による変動は、RT-PCR で調べた。
②KTI と BBI のトリプシンおよびキモトリプシン阻害活性の測定には、各吸水時間の大豆を抽出バッファーでホモジナイズし、その上清を用いた。トリプシンおよびキモトリプシンの人工基質分解反応を吸水波長 410 nm で 22 分間モニタリングした。
③大豆組織における *KTI* と *BBI* の局在は、*in situ* ハイブリダイゼーションで明らかにした。プローブに *KTI* と *BBI* の全長 cDNA を用いた。*BBI* プローブはジゴキシゲニンでラベルし、INT-BCIP で発色した。*KTI* プローブは FITC でラベルし、NBT-BCIP で発色した。

**【結果】** ①*KTI* の発現は、子葉では吸水 24 時間で有意に増加したのに対し、胚では吸水 16 時間で吸水 8 時間よりも有意に減少した。*BBI* の発現は、子葉と胚の両方で吸水 8 時間までに有意に減少した。
②トリプシン活性は、吸水前の大豆により 32.8%阻害されたが、大豆を 32 時間から 40 時間吸水させると、阻害は解除された。このことから、吸水 8 時間までは *BBI* が発現減少したことによりトリプシン阻害は消失したが、子葉における *KTI* が吸水 24 時間で有意に増加したため、再びトリプシン活性の阻害が見られたと示唆した。一方、キモトリプシン活性は、吸水前の大豆により 39.1%阻害され、大豆を 16 時間から 32 時間吸水させてもその阻害は解除されず、さらに増大した。キモトリプシン活性は BBI により阻害されることが知られているが、*BBI* の発現は吸水後 8 時間以内に減少したことから、吸水大豆にキモトリプシン阻害作用を有する BBI 以外の物質が存在することが推定された。
③*BBI* と *KTI* は同一細胞内に存在した。しかし、*KTI* が種子の全体に存在したのに対し、*BBI* は大豆の外層を形成する 2 層には存在しなかった。吸水により *KTI* と *BBI* の発現組織が変化することは無かった。現在、吸水により大豆種子に発現するキモトリプシン阻害物質を探索中である。

imbibition, Bowman-Birk inhibitor, Kunitz trypsin inhibitor

講演番号：3A05p06
講演日時：3 月 19 日 15:25～ A 校舎 05 会場

# 高カカオチョコレート共存下のビフィズス菌 BB536 増殖促進作用

# Growth promotion of Bifidobacterium longum BB 536 in the coexistence of high cacao chocolate.

○稲垣 宏之[1]、平尾 千波[2]、西村 栄作[1]([1]森永製菓株式会社、[2]株式会社森永生科学研究所)
○Hiroyuki INAGAKI[1], Chinami HIRAO[2], Eisaku NISHIMURA[1] ([1]MORINAGA & C0.Ltd., [2]MORINAGA INSTITUTE of BIOLOGICAL SCIENCE, Inc.)

【目的】 腸内細菌叢はヒトにおいて様々な因子と関連し、重要な生体調節作用を持つことが報告されている[1)]。整腸作用を有するビフィズス菌は、乳児期には腸内で優位を占めるが、加齢によってその割合は減少し、代わって大腸菌や腸内で腐敗産物を生成するウェルシュ菌などの占める割合が増加する。一方、チョコレートに配合したビフィズス菌は大腸への到達性が高まるとの報告[2)]や、チョコレートに含まれるカカオフラバノールが腸内でビフィズス菌の割合を増加させたとの報告[3)]も見られる。今回我々は、高カカオチョコレートがビフィズス菌（*Bifidobacterium longum* BB536:以下 BB536 菌）の増殖に及ぼす影響を試験管内で評価した。
【方法】 実験 1：培養液として牛乳にカカオ 70%チョコレート水溶液（10% W/W）または同量の PBS（対照）を添加した。ここに BB536 菌を $10^7$ cfu/mL の菌数で接種した。37℃にて 4 時間および 8 時間培養し、直ちに菌数と pH を測定した。 実験 2：緩衝ペプトン水（BPW）またはカカオ 70%チョコレート（10% W/W）添加 BPW に BB536 菌または *Escherichia coli* NBRC102203(以下 *E.coli*)を $10^5$ cfu/mL 接種した。37℃にて 4 時間および 24 時間培養後生菌数を測定した。
【結果】 実験 1：牛乳中の BB536 菌数（cfu/mL）は 4h 後から 8h 後まで $10^7$ であった。チョコレート添加牛乳では 4h 後 $10^7$、8h 後 $10^8$ であった。培養液の pH は牛乳で初期値に比べ 0.23 低下、チョコレート添加牛乳では 0.59 低下した。実験 2:BPW 中の BB536 菌数(cfu/mL)は 4h 後 $10^5$、24h 後 $10^4$、*E.coli* では 4h 後 $10^8$、24h 後 $10^8$ であった。チョコレート添加 BPW では BB536 菌は 4h 後 $10^5$、24h 後 $10^8$、*E.coli* では 4h 後 $10^7$、24h 後 $10^9$ であった。 以上の結果より、チョコレートは牛乳中で BB536 菌の増殖を促進した。また、チョコレート添加 BPW 中では 24h 後に *E.coli* を 6.3 倍増加させたが、BB536 菌は 13000 倍増加した。BB536 菌はチョコレート共存条件で大腸菌に比べ約 2000 倍の増殖率を示した。
【考察】ビフィズス菌は、発育環境下に高カカオチョコレートが共存することで増殖が促進され、さらに健康に役立つ可能性が示唆された。
【文献】1) *Front Microbiol.* 2016 Aug 19;7:1204.
2) *Int J Food Microbiol.* 2010 Jun 30;141(1-2):97-103.
3) *Am J Clin Nutr.* 2011 Jan;93(1):62-72.

Chocolate, Bifidobacterium longum BB536, Growth promotion

発表責任者：稲垣宏之（h-inagaki-jj@morinaga.co.jp）

講演番号：3A05p07
講演日時：3 月 19 日 15:40～ A 校舎 05 会場

乳酸菌の菌体外多糖類生産に及ぼす添加物の影響
Effects of additives on extracellular polysaccharide production of lactic acid bacteria
○齊田 実紗[1]、大政 健史[2,3] ([1]徳島大院・先端技術、[2]徳島大院・生物資源産業学研、[3]阪大院・工)
○Misa Saita[1], Takeshi Omasa[2,3] ([1]Grad. Sch. of Adv. Tech., & Sci., Tokushima U., [2]Grad. Sch. of Biosci., & Bioind.,Tokushima U., [3]Grad. Sch. of Eng., Osaka U.)

【目的】乳酸菌は、食用乳酸菌摂取時の生理活性として、免疫賦活機能が特に注目され、これには菌体外多糖（EPS：exopolysaccharide）が関係していることが近年明らかになってきている。EPS は乳酸菌によるヒトの免疫システムの活性化に関与しているが、乳酸菌における EPS 生産には未だ解明されていない点がある。そこで、本研究では、乳酸菌（*Lactobacillus delbrueckii* subsp.*bulgaricus*）を用いた多糖類生産に焦点を当て、培地中の添加物（糖酸・カゼイン・脂肪酸・グルタチオン）が及ぼす多糖類生産への影響を検討した。
【実験材料及び方法】　乳酸菌として、*Lactobacillus delbrueckii* subsp.*bulgaricus* を用いた。培養は、Lactose broth 液体培地とスキムミルク液体培地中で 37℃にて行った。菌体濃度は、1 日間隔でサンプルを取得後、寒天平板表面塗抹法を用いて評価した。培地中の添加物が及ぼす影響については、10ml のスキムミルク液体培地中に、ラクトビオン酸・リノール酸（終濃度 2%）、カゼイン・グルタチオン（終濃度 0.5・1・2・5・10%）を添加し、37℃にて 1～6 日間、培養後、生産された多糖類を、RI 検出器を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより解析した。
【結果及び考察】Lactose broth 液体培地中で乳酸菌を 37℃で培養し、1mL の Lactose broth 液体培地中にラクトビオン酸・リノール酸（終濃度 2%）、カゼイン・グルタチオン（終濃度 0.5・1・2・5・10%）を添加し、生菌体濃度を比較した結果、今回添加した添加物は菌体濃度に大きな影響を与えなかった。また、スキムミルク液体培地中で乳酸菌を 37℃で培養し、培地中の添加物について解析した結果、カゼインを 2%添加したときが、比生産速度が最も高く、長期培養を行っても、最終生産物濃度がほとんど減少しなかった。したがって、添加濃度 2%のカゼインを培養時に加えることにより、比生産速度の増加に影響を及ぼすことが推定された。今後、5L 培養槽を用いた培養における、添加物添加の多糖類生産に及ぼす影響について検討する予定である。

Lactic acid bacteria, exopolysaccharide

講演番号：3A05p08
講演日時：3 月 19 日 15:55～ A 校舎 05 会場

# 製パンに適したパネットーネ酵母と乳酸菌ペアの選抜に関する研究

# Study on selecting the pair of a Panettone yeast and a lactic acid bacteria suitable for baking bread.

石本 祐子[1]、西園 葵[1]、長藤 信哉[2]、吉野 精一[3]、○甲斐 達男[1]([1]西南女学院大、[2](株)大賀薬局、[3]辻製菓専門学校)
Yuko ISHIMOTO[1], Aoi NISHIZONO[1], Shinya NAGAFUJI[2], Seiichi YOSHINO[3], ○Tatsuo KAI[1] ([1]Seinan Jo Univ., [2]OHGA Pharmacy, [3]Tsuji Inst.)

【目的】
北部イタリアで自然種から作られるパネットーネは、酵母と乳酸菌の共生発酵によって作られる。母種から単離した酵母と乳酸菌の中から、双方の相性が良く製パン性に優れ、産業利用が期待できる共生ペアの選抜を試みた。
【背景】
パネットーネは、北部イタリアのミラノ地方で百年以上に渡りクリスマスシーズンに作り続けられてきた伝統的な菓子パンである。われわれは、これまで、パネットーネに関して幅広い研究を実施してきた。その一環として、ミラノ大学と協力して、日本人の嗜好に合うパネットーネを得るために、所有株の中から、ベストペアを選抜する研究を実施してきた。今回、その最終結果を報告する。
【方法】
乳酸菌 8 種と酵母 13 種の中から、次の手順に従って、酵母と乳酸菌ペアを絞り込んだ。①液体混合培養における増殖状態、②共生発酵におけるパン生地の発酵状態、③ミニスケールの製パン試験（酵母と乳酸菌による宵種法、さらに、酵母と乳酸菌による宵種に酵母の追い種をしたもの）の結果からベストペアを選抜した。確認実験として、この酵母−乳酸菌ペアでのラージスケールの製パン試験を実施した。結果として、生地発酵力に優れ、風香味豊かな製品が得られた。
【今後の方針】
今回得られた酵母と乳酸菌、および、製パン性に劣る菌株についてゲノム解析を実施し、双方の比較検討によって製パン性に関わる遺伝子の同定とその機能解析を試みる。

Panettone, yeast, lactic acid bacteria

発表責任者：甲斐達男（tatsuo-kai@seinan-jo.ac.jp）

講演番号：3A05p09
講演日時：3 月 19 日 16:10～ A 校舎 05 会場

発酵乳製品用風味強化剤としての Aspergillus oryzae の応用に関する研究
Application of Aspergillus oryzae for flavor enrichment of fermented dairy products
○細野 誠[1]、齋藤 千春[4]、谷口 悠子[4]、小林 謙[2]、若松 純一[2]、木村 彰[3]、玖村 朗人[2]（[1]北大農、[2]北大院農、[3]雪印メグミルク、[4]会社員）
○ Makoto HOSONO[1], Chiharu SAITO[4], Yuko TANIGUCHI[4], Ken KOBAYASHI[2], Junichi WAKAMATSU[2], Akira KIMURA[3], Haruto KUMURA[2] ([1]Hokkaido Univ., [2]Graduate school, Hokkaido Univ., [3]MEGMILK SNOW BRAND Co.,Ltd., [4]Company employee)

市販の微生物プロテアーゼを用いてチーズの熟成促進，風味強化を試みる研究はかなり以前から行われている。麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来のプロテアーゼの使用も例外ではなく，これまでに国内外を問わず幾つかのタイプのチーズを作成する段階で酸性域あるいは中性域に至適活性を有する酵素標品を添加して，品質に及ぼす効果が評価されてきたが，結果的に苦味の生成が指摘されることが多かった。その後，麹菌 *A. oryzae* のゲノム解析より 100 種以上ものプロテアーゼ遺伝子の存在が明らかとなったことから，これらの中からチーズの呈味性向上に貢献し得るプロテアーゼ群を誘導・特定し，更にはその混合比等についても検討を行えば，*A. oryzae* を利用した我国独自のチーズの開発に寄与出来るものと考えた。そこで本学が有する *A. oryzae* AHU 7139，7140，7141，7146 株を，所定の pH に調製したホエイタンパク質ベースの固体培地（タンパク質 20%，乳糖 3%，脂質 1%，水分 75%）で 15 または 20℃で 14 日間培養し，菌体外に分泌されるプロテアーゼの活性とザイモグラフィーのパターンを基に 6 種の培養産物を調製し，ゴーダチーズの製法に倣って製造したカードに混合，加圧，加塩後，3 ヶ月間の熟成に供した。その結果，培養条件は同じでも AHU 7139 株を用いた場合にタンパク質と脂質の分解促進が認められた。特に脂肪分解は顕著で，生成する揮発性脂肪酸は風味へ大きな影響を与えるため，今後，本目的で供試し得る菌株を数多く確保するためには，好適なプロテアーゼ産生株の探索を行う一方で，リパーゼ産生を効率的に制御するための培養条件の検討も必要と考えられた。

cheese, Aspergillus oryzae, protease

講演番号：3A05p10
講演日時：3 月 19 日 16:25～ A 校舎 05 会場

ホエイ固形培地上における食用 Penicillium 属由来のリパーゼ産生
Production of lipase from edible Penicillium sp. on the whey-based solid substrate
○佐藤 恵実[1]、町谷 泰紀[1]、早川 徹[1]、曾根 輝雄[1]、若松 純一[1]、木村 彰[2]、玖村 朗人[1]([1]北大院農、[2]雪印メグミルク)
○Megumi SATO[1], Taiki MACHIYA[1], Toru HAYAKAWA[1], Teruo SONE[1], Junichi WAKAMATSU[1], Akira KIMURA[2], Haruto KUMURA[1] ([1]Graduate school, Hokkaido Univ., [2]MEGMILK SNOW BRAND Co.,Ltd.)

（緒言）チーズに用いられる糸状真菌類として *Penicillium camemberti* および *P. roqueforti* がある。白カビタイプのチーズ中に含まれる遊離脂肪酸含量は青カビタイプのチーズ中のそれに比べて低いため、*P. camemberti* のリパーゼ産生についてはあまり関心が寄せられてこなかった。しかし、発表者らはホエイタンパク質をベースとした固体培地上で培養することで、実際には *P. camemberti* が高いリパーゼ産生能を有することを見出した。本研究では両菌種のリパーゼ産生を比較しながら、その誘導に関わる因子を探索した。
（材料と方法）ホエイタンパク質濃縮物粉末を純水に溶かし、pH 4 または 6.5 に調整した後、湿熱滅菌によって固化させた。必要に応じて滅菌前に乳酸緩衝液（pH 4）を添加した。本学所有もしくはチーズ製造用に市販されている *P. camemberti* および *P. roqueforti* を 3 株ずつ用意し、胞子をホエイ固体培地に播種した後、15 または 25℃で 14 日まで培養を行った。培養産物を回収し、純水と混合してストマッカーで粉砕したものを遠心分離して得た上清液を粗酵素とした。粗酵素の pH を測定した後、ポリビニルアルコールで乳化したオリーブ油を基質として粗酵素を反応させた。遊離した脂肪酸の測定にはフェノールレッド法を用いた。
（結果）*P. camemberti* の場合、全ての菌株において培養の経過と共に粗酵素の pH が上昇し、そのリパーゼ活性が高くなった。供試した 3 株中の 1 株は 15℃での培養において高いリパーゼ産生を示したが、他の 2 株には培養温度による影響は特に認められなかった。一方、*P. roqueforti* においても培養の経過と共に粗酵素の pH が上昇する傾向があったものの、リパーゼ活性は *P. camemberti* よりも低かった。次に培地に乳酸緩衝液を添加しておくことで *P. camemberti* 培養中に生じる pH 変化の抑制を試みた。その結果、培養終了時の pH が酸性側に留まっている場合の方が抽出される粗酵素液中のリパーゼ活性が低下した。以上のことから、本菌種のリパーゼ産生には pH 環境が強く影響していることが示唆された。

Penicillium camemberti, lipase

講演番号：3A05p11
講演日時：3 月 19 日 16:50～ A 校舎 05 会場

アルコール類がショ糖ステアリン酸エステル／水／食用油系の状態図及び乳化性に与える影響
Effects of Alcohols on Phase diagram and Emulsification property of sucrose stearic acid ester / water / edible oil system

○合谷 祥一[1]、松浦 傳史[2,3]、小川 晃弘[3]、中西 真穂[1]([1]香川大農、[2]愛媛大院連農、[3]三菱化学フーズ)
○Shouichi Goutani[1], Tsutashi Matsuura[2,3], Akihiro Ogawa[3], Maho Nakanishi[1] ([1]Kagawa Univ., [2]UGAS-Ehime, [3]Mitsubishi-Kagaku Foods Co.)

1. 緒言

食品に使用可能な界面活性剤である乳化剤は、多様な食品において利用されており、乳化だけで無く様々な機能を発揮している。しかし、複雑な食品系において、その機能が、どのようなメカニズムにより発現されているかを把握することは難しく、昨日の確認は、経験的に、試行錯誤の繰り返しにより、実施されているのが現状である。我々は、先行研究で、ショ糖ステアリン酸エステル/水/食用油系の相状態と乳化性に対するスクロース添加の影響を確認し日本油化学会第 54 回年会にて報告した（1）。その結果は、スクロース添加により、乳化性が増大するというものであった。そこで、今回は、その機能メカニズム解明を目的とし、ショ糖ステアリン酸エステル/水/食用油系を用いて、ショ糖と同じく OH 基を持つ各種アルコール類添加時の状態および乳化性について調べた。

2. 材料および方法

ショ糖ステアリン酸エステルとしては、S-1170（三菱化学フーズ社製、HLB：11）を用いた。ショ糖ステアリン酸エステルと食用油（日清オイリオ社製日清サラダ油、大豆・菜種混合油)、水または、エタノール、1-プロパノール、プロピレングリコール、グリセリン（いずれも、ナカライテスク社製、試薬特級）の各 50%水溶液の 3 成分系について状態図を作成した。また、エタノール、1-プロパノールの 10%水溶液についても同様の操作を行った。また、状態図上の複数の経路により乳化した試料の粒度分布を SALD-7100（島津製作所社製）により測定し、乳化経路における状態と粒子径の関係について調べた。

3. 結果と考察

エタノール、1-プロパノール添加系では、状態図上の油分離領域が拡大した。一方、プロピレングリコール、グリセリン添加系では、逆に油分離領域が縮小した。また、状態図上の異なる経路における乳化を行い、粒度分布を比較したところ、プロピレングリコール及びグリセリン添加系では、他と比べて明確に粒子径が小さくなる傾向がみられた。

1 ：松浦ら，日本油化学会第 54 回年会講演要旨集，p.131，(2015).

sucrose stearic ester, emulsification, phase diagram

発表責任者：合谷　祥一（gohtani@ag.kagawa-u.ac.jp）

講演番号：3A05p12
講演日時：3 月 19 日 17:05～ A 校舎 05 会場

# レモン飲料における、風香味および糖・酸含量の嗜好性への影響

# The effects of sensory characteristics on palatability of lemon-flavor beverages

○丸山 弘明[1,3]、荒木 茂樹[1]、中島 美樹[2]、坂井 信之[3]([1]サッポロホールディングス（株)、[2]ポッカサッポロフード&ビバレッジ（株)、[3]東北大)
○Hiroaki MARUYAMA[1,3], Shigeki ARAKI[1], Miki NAKASHIMA[2], Nobuyuki SAKAI[3] ([1]SAPPORO HOLDINGS Ltd., [2]POKKA SAPPORO Food & Beverage Ltd., [3]Tohoku Univ.)

【背景・目的】レモンは爽やかな香りと強い酸味を風香味に持つ果物で、その爽やかな特徴から世界的にも清涼飲料やアルコール飲料のフレーバーとして多く用いられている。レモン飲料において、香り特徴および酸味と甘味のバランスは、レモンの果物感を含めた味、さらには、嗜好性へ強く影響し、大変重要な要素であると考えられている。一方、近年では、飲料における嗜好性の多様化が進み、消費者の様々なニーズに合わせた製品開発が求められている。本研究では、消費者のレモン飲料への嗜好性を明らかにすることを目的として、レモン飲料の風香味（フレーバーの種類）および味（糖度と酸度のバランス）を調整した試料を用いた嗜好調査と分析型官能評価を実施した。
【方法】嗜好性調査：事前選抜した対象者にて、セントラルロケーションテストを実施した。風香味の調査では 15-39 歳の 313 名を対象者とし、レモン果実に含まれる香気成分の特徴に基づき、それぞれを強化させた 7 種類の飲料を調製して用いた。味の調査では 15-49 歳の 325 名を対象者とし、糖度および酸度の比が、市場製品群を網羅する 15 点の飲料を調整して用いた。評定は、嗜好性（全体のおいしさ）および、数点の味覚特性を項目とし、9 段階尺度法を用いた。試料は 1 つずつ提供し、順序はランダム化した。
分析型官能評価：ポッカサッポロフード&ビバレッジ社において、基本五味の識別テストおよび、味の濃度差識別テストの合格者を専門パネルとした。風香味の評価は 9 名、味の評価は 10 名の専門パネルにて、それぞれ QDA 法による分析型官能評価を実施した。
【結果】風香味：全体では、人工的で甘い感じの強いファンシータイプの嗜好性が高く、果実特徴を強化した各試料間では違いは確認できなかった。プリファレンスマッピングの結果、6 つの嗜好クラスターが見出され、各クラスターの対象者の嗜好性は分析型官能評価によって明確化したそれぞれの風香味特徴と関係する傾向が確認できた。また、各クラスターの対象者の属性は異なる傾向であった。
味：全体では、糖度の大きい試料ほど嗜好性が高くなる傾向が確認できた。プリファレンスマッピングの結果、4 つの嗜好クラスターが見出され、そのうち 3 つのクラスターの対象者は、分析型官能評価によって明確化した風香味特徴の甘い方向を好む傾向が確認できた。残る 1 つのクラスターの対象者は、他のクラスターの対象者と比べて酸味の強い、糖度と酸度のバランスを好む傾向であった。また、嗜好性および味覚特性間の偏相関関係から、他クラスターの対象者では「甘さ」が嗜好性と関係するのに対し、このクラスターの対象者は「レモンの果汁感」が嗜好性に関係することが確認できた。

palatability, preference, lemon

発表責任者：丸山弘明（hiroaki.maruyama@sapporoholdings.co.jp）

講演番号：3A05p13
講演日時：3 月 19 日 17:20～ A 校舎 05 会場

Release rate of allyl sulfide from cyclodextrin inclusion complex powders
○Thi Van Anh NGUYEN[1,2,3], Hidefumi YOSHII[2,3] ([1]Hue University of Agriculture and Forestry, [2]Ehime Univ., [3]Kagawa Univ.)

【Purpose】Allyl sulfide is organosulfur compound which has been used as garlic flavor in food industry. It has low solubility, strong odor, labile so it is difficult to handle in food industry. Molecular encapsulation with cyclodextrin (CD) is efficient method to protect labile flavor, to hide strong odor or to increase solubility because of formation of inclusion complex of cyclodextrin and flavor. Stability of inclusion complex powders in storage condition will be important point for industrial application. In this study, release behavior of allyl sulfide from α–, β–, and γ–cyclodextrin inclusion complex powder was studied.

【Materials and Methods】Inclusion complex powders were formed by spray drying inclusion complex slurry of allyl sulfide diluting in medium–chain–triglyceride and three types of cyclodextrin (α–, β–, and γ–CD). The inclusion complex powders were kept at 50 ºC and 0%, 39%, 51%, and 75% relative humidity (RH) in closet box. RH of 0% was controlled by using silicagel and RH of 39%, 51%, and 75% were maintained by using saturated salt potassium carbonate, potassium iodide, and sodium chloride, respectively. These powders were also storaged at 60 ºC, 80 ºC, and 100 ºC without control RH in an oven. The storage powders were samples at fixed days for 3 weeks to measure allyl sulfide retention. GC–FID was used to investigate allyl sulfide content as following conditions column, fused silica capillary 30 m × 0.25 mm × 0.5 μm (Ulbon HR-1; Shinwa Chemical Industries Ltd., Kyoto, Japan); detector, flame ionization, 200°C; carrier gas, nitrogen, 70 kPa; column temperature, constant at 80 °C. Retention of allyl sulfide in α–, β–, γ–CD inclusion complex was correlated by the first–order release rate constant with Gaussian distribution of activation energy.

【Results and Discussion】At 50 ºC and 75% RH, release rate constants from inclusion complex powder of α– and β–CD with allyl sulfide were obtained 0.25 ($day^{-1}$) and 4.51 ($day^{-1}$), respectively using the same standard deviation of activation energy, 3. At the same storage condition, release rate constant from inclusion complex powder of γ–CD with allyl sulfide was obtained 6.03 ($day^{-1}$) with standard deviation of activation energy 1.5. Allyl sulfide in the inclusion complex powder of α–CD was very stable.

release, allyl sulfide, cyclodextrin

発表責任者：Hidefumi YOSHII（foodeng.yoshii@ag.kagawa-u.ac.jp）

講演番号：3A05p14
講演日時：3 月 19 日 17:35～ A 校舎 05 会場

# 乳化 *d*-リモネン噴霧乾燥粉末からの *d*-リモネン徐放速度に及ぼす賦形剤の影響

# Effect of wall material on the release rate of *d*-limonene from spray-dried *d*-limonene powder

○吉井 英文[1]、高重 至成[1]、四日 洋和[2]、安達 修二[3] ([1]香大農、[2]京都学園大、[3]京大農)
○Hidefumi YOSHII[1], Shisei TAKASHIGE[1], Hirokazu SHIGA[2], Shuji ADACHI[3] ([1]Kagawa Univ., [2]Kyoto Gauen Univ,, [3]Kyoto Univ.)

[目的] フレーバーは食品のおいしさに深くかかわっているため，近年，種々の粉末香料が用いられている．噴霧乾燥による粉末香料の作製において，噴霧乾燥時のフレーバー及び，粉末回収率に加え，粉末貯蔵時のフレーバーの酸化安定性や粉末からのフレーバー徐放性などが重要となる．フレーバーの徐放は，保存環境の温湿度の影響を強く受け，粉末の賦形剤が有する物理化学的特性が大きく関係すると考えられているが，詳細な研究は行われていない．よって，本研究では噴霧乾燥粉末中の *d*-リモネンの徐放挙動に及ぼす賦形剤の物理化学的特性を明らかにすることを目的として，スクロース(Suc)，α-ラクトース(Lac)，マルトース(Mal)，マルトデキストリン(MD，DE=40，25，19)を賦形剤として用いて *d*-リモネン噴霧乾燥粉末を作製し，その粉末を用いて *d*-リモネンの徐放挙動を測定した．
[方法] 蒸留水に賦形剤として Suc，Lac，Mal，MD(DE=40，25，19)，乳化剤として乳蛋白質加水分解物(エマルアップ，森永乳業)，抗酸化剤としてアスコルビン酸ナトリウムを加えて溶解した後，*d*-リモネンと中鎖脂肪酸トリアシルグリセロール(アクター M-2，理研ビタミン)を添加し，攪拌して乳化液を作製した．次いで，乳化液を噴霧乾燥機(L-8 型，大川原化工機製)で乾燥し，*d*-リモネン噴霧乾燥粉末を調製した．作製した粉末を，目開き 106-150 μm の篩で分級し，恒温定速湿度増加条件下と恒温恒湿条件下の 2 種類の条件で粉末からの *d*-リモネン徐放挙動を測定した. 恒温恒湿条件下では 50℃で，相対湿度を 44，58，68，75，83%RH に設定したデシケーター内に貯蔵した．
[結果および考察] 50℃における恒温定速湿度増加条件下では，乳化 *d*-リモネン噴霧乾燥粉末からの *d*-リモネンは特定の湿度から徐放し始め，湿度の増大によって著しく増大した． *d*-リモネンの徐放が開始する相対湿度は賦形剤によって異なり，それぞれ，Suc 55%，Lac 65%，Mal 62%，MD(DE=40) 68，MD(DE=25) 72%，MD(DE=19) 80%RH 付近であった．徐放開始湿度と各賦形剤のガラス転移温度($T_g$)の大小にはそれぞれ相関が見られたため，これら湿度と徐放速度に及ぼす湿度の影響として，吸湿によるガラス転移温度の低下が大きな要因として推察される．恒温恒湿条件下において，賦形剤に MD 系を用いた場合，湿度の増加によって徐放速度定数も増加し，相対湿度と徐放速度定数には相関がみられた．しかし，賦形剤に Suc と Lac を用いた場合，相対湿度と徐放速度定数には相関がみられず，Suc，Lac と MD 系には顕著な違いがみられた．これらの結果より，噴霧乾燥粉末中の *d*-リモネンの徐放挙動に及ぼす賦形剤の物理化学特性として $T_g$ をはじめとする様々な特性が影響することが示唆された．

flavor, spray-dried powder, release

講演番号：3A05p15
講演日時：3 月 19 日 17:50～ A 校舎 05 会場

# Comparison of 1-MCP Release From Inclusion Complex and Coating Paper Under Exposure of Linear Ramping Humidity

○HERMAWAN DWI ARIYANTO, SHOTA INAHATA, HIDEFUMI YOSHII (Kagawa Univ.)

【Purpose】1-Methylcyclopropene (1-MCP) is the most valuable compound to inhibit ripening for maintaining fruit quality after postharvest processing and distribution handling of climacteric fruits. Decreasing fruit quality during postharvest handling especially for the climacteric fruits are greatly impacted by ripening, decaying and senescence because of ethylene action. Currently, 1-MCP is commercially available in the form of an inclusion complex with alpha-cyclodextrin (α-CD) as the wall material. Previously, the release of 1-MCP during storage time was studied at constant humidity. The current research is aimed to investigate release behaviour of 1-MCP under linear ramped humidity.

【Materials and Methods】Initially, 1-MCP gas was obtained with synthesis reaction between phenyllithium solution in dibutyl ether and 3-chloro-methylpropene. The formation of 1-MCP inclusion complex with α-CD (Ensuiko Sugar Refining Co., Ltd. Tokyo, Japan) as wall material was produced at the laboratory by followed previous research with minor modifications. The formation of 1-MCP coating paper was produced by mixing 1-MCP inclusion complex with polymer as a coating material. A roller was used to spread 1-MCP slurry on the paper. Then, the 1-MCP coated paper was dried for 3 min to evaporate the ethanol. The release of 1-MCP from coating paper under linearly ramped humidity was monitored by A Shimadzu GC-14B gas chromatograph (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan). The relative humidity (RH) was ramped from 10 to 90% at the rate of 0.33% RH/min over a release period of 4 h.

【Results and Discussion】The release of 1-MCP experiments were investigated under ramping humidity at constant temperatures of 50 $^{o}$C. 1-MCP from the inclusion complex and its coating paper release slowly at low humidity (10-50% RH). In the case of inclusion complex, the release of 1-MCP increased at 60% RH. However, for coating paper case, the release of 1-MCP increased at 70% RH. This result shows that the coating of 1-MCP inclusion complex improved the response of 1-MCP release for the humidity change.

Coating paper, 1-MCP, Release behaviour

発表責任者：Hidefumi Yoshii（foodeng.yoshii@ag.kagawa-u.ac.jp）

講演番号：3A05p16
講演日時：3 月 19 日 18:05～ A 校舎 05 会場

生理計測によるチョコレートアイスクリームバーの評価
Evaluation of chocolate-coated ice cream bars using the electromyographic activity of the suprahyoid musculature analysis and the tongue pressure measurement

○岩井 大[1]、有澤 英司[1]、渡部 加苗[1]、井上 恵介[1]、池田 三知男[1]、堀 一浩[2]、小野 高裕[2]([1]森永乳業・研究本部、[2]新潟大学大学院医歯学総合研究科)
○Hajime IWAI[1], Eiji ARISAWA[1], Kanae WATANABE[1], Keisuke INOUE[1], Michio IKEDA[1], Kazuhiro HORI[2], Takahiro ONO[2] ([1]Morinaga Milk Industry Co.,LTD・R&D Division, [2]Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences)

【目的】咀嚼・嚥下過程において食品の物性は大きく変化するが、特に凍結物であるアイスクリームではその変化が顕著である。今回、チョコレートコーティングされたアイスクリームバーを対象として、ヒトの咀嚼や舌の動きを測定することができる生理計測から得られたパラメータと、アイスクリームバーのチョコレートやアイスの口どけ感などの食感や風味に関する官能評価値、チョコレートコーティングの溶融性などの物性値との相関を調べた。さらに、それぞれの製品特徴の評価（マッピング）を行い、咀嚼連筋や舌活動の様式に与える影響を検討した。
【方法】評価サンプルとして市場で購入したチョコレートコーティングされたアイスクリームバー4品（種類別アイスクリーム３品、種類別ラクトアイス 1 品）を用いた。4 名の被験者（男 3 名、女 1 名、平均 31.3 才）を対象に、-20℃の冷凍庫から取り出し直後のサンプルを 4 口分自由摂食・嚥下させたときの摂食時間及び咬筋・舌骨上筋群活動量を筋電位測定装置（MP150WS、Biopac systems 社製）、舌圧（口蓋にかかる圧力）をフィルム状のセンサーシートを用いた圧力評価システム（Swallow scan system、ニッタ株式会社製）で測定した。メルトダウンテストは、チョコレートコーティングを剥離したアイスを-25℃で調温後、室温にて、1 分毎の融解率を 120 分まで測定した。チョコレートコーティングの油脂固体脂指数の測定は、示差走査熱量計（DSC-60Plus、島津製作所社製）を用いて行った。官能検査は、13 名の専門パネリストと 62 名の一般評価者を対象に、採点法に基づいて評価した。
【結果】チョコレートアイスクリームバー摂食時の舌骨上筋群活動量、舌圧の生理計測パラメータは、チョコレートコーティングとアイスの口どけ、なめらかさ、チョコレートコーティングとアイスの口どけのバランスといった食感を評価する官能項目との相関が高かった。すなわち、生理計測はアイスクリームのおいしさを理解し、数値化するための有効なツールであることが示された。一方、チョコレートアイスクリームバーのアイス部のメルトダウン試験結果とチョコレートコーティング部の油脂固体脂数は、生理計測データと相関が低かった。これらの結果より、チョコレートアイスクリームバーは、アイスやチョコのそれぞれ個別の物性ではなく、一つのまとまった食塊となった時の物性が、咀嚼や舌活動に影響を与えていることが示唆された。

ice cream, chocolate, the tongue pressure measurement

発表責任者：岩井　大（h_iwai@morinagamilk.co.jp）

講演番号：3A06a01
講演日時：3 月 19 日 09:20～ A 校舎 06 会場

ストレス誘導性記憶の減衰の改善・予防―牡蠣抽出物―
Improvement of stress-induced decline of memory of mouse by a food (oyster extracts)
○松田 桂[1]、木屋 佳奈恵[2]、松田 芳和[3]、河村 幸雄[1,2]([1]京女大・院、[2]京女大、[3]日本クリニック（株））
○Katsura MATSUDA[1], Kanae KIYA[2], Yoshikazu MATSUDA[3], Yukio KAWAMURA[1,2] ([1]Grd.Schl of Kyoto Women's University, [2]Kyoto Women's University, [3]Japan Clinic Co., Ltd.)

**【目的】**加齢やある種の病的状態に起因する意欲や認識力や記憶の減退が、食品（成分）により予防や改善ができるかは、記憶や行動のような高次機能の定量的評価の困難性から未知の研究領域である。本研究では、マウスの学習と記憶に及ぼすストレスの影響の評価に、空間認識の標準法とされるモリスの「水迷路試験(Atlantis Platform 法)」と「強制遊泳試験（Forced Swim Test:FST)」の有用性を検証するとともに、空間位置認識と学習並びに記憶の持続性の定量化が可能かどうか、またそれらにおよぼすストレスの影響と食品（成分）のマウスの記憶能や意欲に及ぼす影響を検討した。
**【方法】**マウス（ddy,♀,9 週齢）の空間位置の認識と学習は「水迷路試験法」を用いて測定した。直径 120×高さ 50cm の円柱形プールに水を張り、その中心に直径 9cm の透明な円柱プラットフォーム(以下 P）を水面上 1cm に設置し、遊泳させた。マウスの本能的な水忌避行動を利用して、１週間その位置を学習させ位置記憶を定着させた。その後、同位置の P をマウスが視認できない水面下 1.0cm に沈め、P を発見できるかどうか、また発見までの時間（マウスの生来の記憶の継続の尺度として）を解析した。定着した学習記憶（の保持と減衰）に対するストレスの影響は、1 日 1 回 1 時間 6 日間閉所「強制遊泳」により水中拘束ストレスを行った群とストレス負荷のない群の P の位置記憶の減衰の程度を比べることにより評価した。また、このようなストレスが学習記憶に与える影響に対する食品（成分）の影響を、今回は亜鉛に富んだ牡蠣熱水抽出物を混餌投与することにより検討した。
**【結果】**①マウスの空間的位置学習：視認できる水面上 P の位置の認識と記憶は、連続 5 回/日、6 日間の学習で速くなり、P の発見到達にかかった時間は、初日が 166 秒(100%)で 6 日後には 10 秒(6%)に短縮されていた。　②学習定着 2 日後、P を水面下に沈めた P の発見時間は学習 6 日目と同じであり P の位置を記憶していると推定された。これを確認するために、P の位置を学習時のプール中心からプール壁に移動して水面下 1cm に沈めた場合、P の発見時間は 5 倍以上に遅延するか、発見できないマウスがいた。このことはマウスが、P の位置を記憶していたことを示している。　③この位置記憶は、1 週間後 100%、1 ヶ月後でも 80% 程度保持されていた。　④学習定着マウスに水中拘束ストレスを 1 週間かけたところ定着記憶は、10%程度に減衰したが、ストレス非負荷群では 100%保持されていた。　⑤2-5%牡蠣熱水抽出物食を摂食した群では、このようなストレスによる記憶の減衰は抑制され、記憶は 60%程度保持されていた。　⑥以上のことは、牡蠣熱水抽出物の摂取はマウスのストレス誘導性記憶の減衰を抑制することを示している。

stress, memory, depression

講演番号：3A06a02
講演日時：3 月 19 日 09:35～ A 校舎 06 会場

ローヤルゼリーの抗うつ様効果に関する基礎的研究
Laboratory studies on the antidepressant-like effect of royal jelly
○家垣 典幸[1]、成田 幸夫[1]、服部 徳子[1]、森田（平田） 洋子[2]、市原 賢二[1] ([1]アピ（株）長良川リサーチセンター、[2]岐阜大院・連合創薬)
○ Noriyuki IEGAKI[1], Yukio NARITA[1], Noriko HATTORI[1], Yoko MORITA(HIRATA)[2], Kenji ICHIHARA[1] ([1]Nagaragawa Research Center, API Co., Ltd., [2]Gifu Univ.)

【目的】ローヤルゼリー（RJ）は、働き蜂が女王蜂を育てるために分泌する物質であり、滋養強壮や肉体疲労などの目的で健康食品素材として広く用いられている。近年、プラセボ対照比較試験において、RJ（6 ヵ月間摂取）による「心の健康」の改善効果が報告された [1)]。我々は、基礎研究にて RJ の効果を検証し、作用機序を解明することを目指している。本研究では、軽度のストレスをランダムに負荷する予測不可能な慢性マイルドストレス（UCMS）モデルを用いて、RJ の抗うつ様効果を検討し、ストレス応答に関わる組織として副腎の網羅的な遺伝子発現解析を実施した。
【方法】7 週齢 BALB/c 雄性マウスを使用し、無処理（Control）群、ストレスとして浸水床敷、空ケージ、傾斜、夜間点灯、明暗反転、絶食、絶水、拘束および強制水泳をランダムに 3 週間負荷した UCMS 負荷群および UCMS を負荷し凍結乾燥 RJ（FDRJ）を 4%含有した飼料を与えた FDRJ 群の計 3 群を設けた。UCMS を 3 週間負荷後、尾懸垂試験における不動時間を抑うつ様行動として測定し、その翌日に副腎を採取した。各試験群から代表的な 3 個体を選び、それらの副腎から total RNA を抽出後、SurePrint G3 Mouse GE マイクロアレイキット 8x60K v2（アジレント社）を用いて、網羅的な遺伝子発現解析を行った。統計的に有意かつ 1.5 倍以上の発現差を示したプローブを発現変動候補遺伝子と判断し、アノテーションデータベース DAVID を用いたジーンオントロジー（GO）解析およびネットワーク/パスウェイ解析ソフト IPA（Ingenuity Pathways Analysis）を用いたパスウェイ解析を実施した。
【結果・考察】尾懸垂試験の結果、Control 群と比較し、UCMS 群で不動時間の延長が見られたが、FDRJ 群では認められなかったことから、RJ の摂取はストレス負荷による抑うつ様行動を抑制することが示唆された。副腎におけるマイクロアレイ解析の結果、Control 群に対して UCMS 群で 1158 遺伝子、UCMS 群に対して FDRJ 群で 196 遺伝子の発現変化が示唆された。UCMS 負荷による変動候補遺伝子はステロイドの生合成の GO に複数含まれ、これらは発現上昇を示した。一方、FDRJ 群では生体異物やコレステロールの解毒に関与するパスウェイに変動候補遺伝子が複数含まれていた。
本研究の試験結果は各群 3 個体のアレイデータに基づいたものであるため、今後、他の個体についても変動候補遺伝子の発現を確認し、RJ の作用機序の解明に繋げていく。
1) *Nutrition Journal* 2012 Sep 21;11(1):77.

royal jelly, depression, microarray

講演番号：3A06a03
講演日時：3 月 19 日 09:50～ A 校舎 06 会場

# コラーゲン由来抗うつペプチドの同定およびその脳脊髄液への移行

Identification of antidepressant collagen peptide and the penetration into cerebrospinal fluid

○永井 研迅、東 奈央、水重 貴文、蕪山 由己人 (宇都宮大農)
○Akitoshi NAGAI, Nao AZUMA, Takafumi MIZUSHIGE, Yukihito KABUYAMA (Utsunomiya Univ.)

【背景・目的】

これまで我々は、コラーゲン加水分解物に抗うつ作用が認められることを見出した。しかしながら、その活性成分は明らかになっていない。また、コラーゲン加水分解物を摂取した際、Pro-Hyp（PO）や Hyp-Gly（OG）などのジペプチドが血中に移行していることが明らかになっている。本研究では、コラーゲン加水分解物の抗うつ作用の活性成分の同定およびその脳脊髄液中での検出を目的とした。

【方法】

マウスに、PO、OG、P、O、およびそれらアミノ酸の混合物（P+O）を 3 日間連続で経口投与した。3 日目に、6 分間の強制水泳試験を実施した。その間の無動時間を測定し、抗うつ活性を評価した。また、うつとの関連が指摘されている脳海馬の神経新生を調べるため、PO を 3 日間経口投与し、増殖細胞マーカーである Ki67 を免疫染色した。脳海馬歯状回の Ki67 陽性細胞数を計測した。同様に、3 日間強制水泳ストレスを負荷した場合でも検討した。ラットに、コラーゲン加水分解物を経口投与した後、経時的に脳脊髄液を採取し、LC/MS で PO および OG を定量した。

【結果】

PO は、無動時間を用量依存的に減少させた。OG、P、O、P+O による無動時間の変化は見られなかった。PO による Ki67 陽性細胞数の変化は見られなかった。強制水泳ストレス負荷により Ki67 陽性細胞数は減少し、PO はその減少を改善した。コラーゲン加水分解物を経口投与したラットにおいて、脳脊髄液中に PO が検出された。その濃度は、投与 60 分後で最も高濃度であり、その後 180 分まで維持された。脳脊髄液中の OG の濃度は、PO の濃度より低濃度であった。

【結論】

PO は、経口投与で有効な抗うつ作用を示すことが明らかになった。また、PO は、ストレス負荷による海馬神経新生の減少を改善した。経口摂取後に脳脊髄液で PO が存在し、脳で直接作用する可能性が示された。

Collagen, Depression, Neurogenesis

講演番号：3A06a04
講演日時：3 月 19 日 10:05～ A 校舎 06 会場

ビタミン E 欠乏食摂取がマウスの不安行動に与える影響
Effect of dietary vitamin E deficiency on anxiety-like behavior in mice
○渡邊 佑、遠藤 駿、竹中 麻子（明治大農）
○Tasuku WATANABE, Shun ENDO, Asako TAKENAKA (Meiji Univ.)

【背景と目的】
ビタミン E (VE) は抗酸化作用をもつ脂溶性ビタミンである。我々は、4 週間の VE 欠乏食摂取が Wistar ラットの新奇環境下での不安行動増加を引き起こすことを報告してきた。一方マウスでは、VE 輸送タンパク質欠損による重篤な VE 欠乏が不安行動を増加させることが報告されているが、食餌性 VE 欠乏の影響は検討されていない。そこで本実験では、VE 欠乏食摂取がマウスの不安行動へ及ぼす影響を、成長段階が異なるマウスを用いて検討した。
【方法】
実験１（成長期の VE 欠乏の影響）： 6 週齢 C57BL6/J 雄マウスを 32 匹購入し、対照食摂取群（CON）と VE 欠乏食摂取群（E-）に分けた。飼育 28 日目に高架式十字迷路（EPM）試験を、飼育 30 日目にオープンフィールド（OF）試験を行い、不安行動を測定した。EPM 試験直後に尾から採血を行い，血漿を回収した。飼育 39 日目に解剖を行い、心臓からのヘパリン血漿、各脳部位を採取した。
実験２(授乳期からの VE 欠乏の影響)： 9 週齢の C57BL6/J マウスの雌を 16 匹妊娠させ、妊娠 16 日目に CON と E-に分けた。仔マウスを生後 24 日目に離乳し、それぞれの母マウスと同じ実験食を与えて１ケージあたり 5～6 匹で飼育した（CON:n=10、E-:n=11)。生後 68 日目に EPM 試験を、生後 70 日目に OF 試験を行い、不安行動を測定した。生後 78 日目に解剖を行い、心臓からのヘパリン血漿、各脳部位を採取した。
【結果と考察】
大脳皮質及び血漿中のα-トコフェロール濃度は、いずれの実験でも VE 欠乏食摂取により有意に低下した。EPM 試験において、実験１では VE 欠乏の影響はみられなかったが、実験２では VE 欠乏食摂取により不安行動が有意に増加した。OF 試験では、実験 1、実験 2 共に VE 欠乏による有意な影響は現れなかったが、実験２で VE 欠乏食摂取により不安行動が増加する傾向が得られた。以上の結果より、VE 欠乏食摂取は C57BL6/J マウスの不安行動を増加させるが、この増加には授乳期からの VE 欠乏が必要であることを明らかにした。

Vitamin E, anxiety, tocopherol

発表責任者：竹中麻子（takenaka@meiji.ac.jp）

講演番号：3A06a05
講演日時：3 月 19 日 10:20～ A 校舎 06 会場

エイコサペンタエン酸とドコサヘキサエン酸の抗不安作用の比較検討
Comparative study on anxiolytic effect of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid
○大島 靖世[1]、渡邊 佑[1]、渡辺 剛[2]、長田 恭一[1]、竹中 麻子[1] ([1]明治大農、[2]タマ生化学（株））
○Yasuyo OHSHIMA[1], Tasuku WATANABE[1], Tsuyoshi WATANABE[2], Kyoichi OSADA[1], Asako TAKENAKA[1] ([1]Meiji Univ., [2]TAMA Biochem. Co., LTD)

【目的】我々は、エイコサペンタエン酸（EPA）を添加した食餌の摂取が、個別飼育時の社会的隔離ストレスで生じる不安に対して強い抑制効果を有することを、ラットを用いて明らかにしてきた。n-3 系多価不飽和脂肪酸が不安を抑制することは数多く報告されているが、個々の脂肪酸（EPA、ドコサヘキサエンサン（DHA））の不安抑制効果の比較検討例は少ない。そこで本研究では、EPA 添加食、DHA 添加食をラットに与え、不安行動に及ぼす影響を比較した。
【方法】3 週齢の Wistar 系オスラットを、EPA 添加食群、DHA 添加食群、対照食群の 3 群に分けて 2 週間個別飼育した。EPA 添加食は EPA 含量 42%の精製魚油（EPA-40）3%とコーン油 2%、DHA 添加食は DHA 含量 46%の精製魚油（DHA-46）3%とコーン油 2%、対照食はコーン油 5%を油脂として含む精製飼料（AIN93G に準じた組成）とし、自由摂取で与えた。EPA-40・DHA46 は EPA・DHA をトリグリセリドとして含む油脂であり、コーン油、EPA-40、DHA-46 の脂肪酸組成はガスクロマトグラフィーにより分析した。飼育 2 週間後に高架式十字迷路（EPM）試験およびオープンフィールド（OF）試験による各 15 分間の行動試験を行い、EPM 試験では open arm 活動量、head dipping（迷路から下を覗く探索行動）、stretch out（体を伸ばして探索を躊躇する行動）を、OF 試験では center area 活動量、supported/unsupported rearing（立ち上がり）、grooming（毛づくろい）を行動指標として測定し、解析結果を 5 分ごとに分けて解析した。解剖後、前頭皮質のリン脂質画分の脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーにて測定した
【結果】飼料中の油脂の脂肪酸組成の測定結果より、EPA 添加食は脂肪酸含有率で EPA を 26.2%、DHA を 7.7%含み、DHA 添加食は EPA を 4.0%、DHA を 28.0%含むと算出した。飼育期間中の摂食量・体重には群間で差は認められなかった。EPM 試験では、初めの 5 分間の open arm 活動量が EPA 群で有意に増加し、5 分以降の stretch out が有意に低下した。OF 試験では、初めの 10 分間の center area 活動量と unsupported rearing が EPA 群で有意に増加した。一方、DHA 添加食群では対照群と比較して有意な行動指標の変化はみられなかった。これらの行動試験の結果から、EPA 添加食は強い不安抑制効果を示すが、DHA 添加食には不安抑制効果がみとめられないことが示された。また、前頭皮質のリン脂質画分の脂肪酸割合は、EPA 添加食摂取により EPA が検出限界以下から 0.2%に増加し、DHA 添加食摂取により DHA が 12.3%から 14.9%へと有意に増加した。以上の結果より、EPA 添加食、DHA 添加食はいずれも脳内の濃度を上昇させるが、社会的隔離ストレス下のラットに対する不安抑制効果は EPA の方が DHA よりも大きいと結論した。

EPA, DHA, anxiety

発表責任者：竹中麻子（takenaka@meiji.ac.jp）

講演番号：3A06a06
講演日時：3 月 19 日 10:45～ A 校舎 06 会場

# 日本酒成分の NMDA 型グルタミン酸受容体への効果

# Effects of Components of Sake on the NMDA (N-methyl-D-aspartate)Receptors

○矢吹 智[1]、則包 潔人[1]、立溝 博也[1]、伊豆 英恵[2]、山田 康枝[1] ([1]近畿大院　システム工学研究科、[2]酒類総合研究所)
○Tomo YABUKI[1], Kiyoto NORIKANE[1], Hiroya TATEMIZO[1], Hanae IZU[2], Yasue YAMADA[1] ([1]Grd. Sch. of Sys. Engineering. Kinki Univ., [2]Natl. Res. Inst. of Brewing.)

【目的】NMDA 型グルタミン酸受容体（NMDA 受容体）は脳に多く存在し，高い $Ca^{2+}$透過性を有するイオンチャンネルのひとつである．神経可塑性の中心的役割を担い，記憶形成，学習，運動等に深く関与しており，認知症や神経疾患などの病気の原因にかかわりのある受容体である．NMDA 受容体に作用する物質は神経疾患の治療や研究に利用可能である．また，D-セリンは NMDA 受容体のアゴニストとして知られている．日本酒は古来より飲用され 1000 種類以上の物質が含まれているが，その物質と生理活性は不明な点が多い．日本酒成分の生理活性を知るために，成分の分析を行い，日本酒成分であるアミノ酸，ジペプチドやアミンの NMDA 受容体に対し効果を検討してきた．今回，NMDA 受容体の 4 つあるサブタイプのうち，脳の大脳皮質や海馬に多く存在する GluN1/GluN2A，GluN1/GluN2B 受容体に対する日本酒成分の効果とその精神作用についてもマウスを用いた行動実験で検討した．
【方法】マウス NMDA 受容体の GluN1，GluN2A 及び GluN2B サブユニットの mRNA をアフリカツメガエルの卵母細胞にインジェクションし，20℃で 24～48 時間インキュベートし，発現させたものを受容体活性測定に使用した．膜電位を－70 mV に固定し，二電極膜電位固定法により活性を測定した．今回，イオン交換樹脂を用いて純米酒を 4 つに分画し，各画分をメタボローム解析し，含有量が多かった成分のうち，A 画分（有機酸等）成分（N-acetylaspartate (NAA)， 5-oxoproline，cysteic acid 等)，C 画分（塩基性アミノ酸，ペプチド等）成分 （ornithine，betaine，chorine、trimethylamine N-oxide、isoamylamine、2-phenylethylamine、glycylglycine (GlyGly)等）とのグルタミン酸 100 μM/グリシン 100 μM 存在下での NMDA 受容体活性への効果を検討した．また，NMDA 受容体に対して高い阻害効果を示した日本酒成分の抗不安作用を検討するためにマウスを用いて高架式十字迷路試験を行った．
【結果と考察】日本酒成分を比較検討した結果，新たに受容体活性を活性化または阻害する物質を見つけた．trimethylamine N-oxide は，GluN2A と GluN2B 受容体に対して活性化効果を示した．NAA，ornithine，choline，5-oxoproline，cysteic acid と 2-phenylethylamine は，両受容体に対して阻害効果を示した．betaine と isoamylamine は GluN2A 受容体に対しては活性化効果を示し、GluN2B 受容体に対し阻害効果を示した．高架式十字迷路試験では isoamylamine と 2-phenylethylamine で有意に抗不安効果が見られ，この 2 成分において抗不安作用があることが明らかになった．以上の結果から，日本酒中には NMDA 受容体活性及び精神活動に影響を与える物質が多く存在することが示された．

N-methyl-D-aspartate Receptors, Sake, 2-phenylethylamine

講演番号：3A06a07
講演日時：3 月 19 日 11:00～ A 校舎 06 会場

# 食肉成分カルノシンによるエクソソームを介した脳腸相関活性化

# Carnosine-induced activation of gut-brain interaction mediated by exosome

○杉原 由佳[1]、門岡 桂史[2]、片倉 喜範[3]（[1]九大院・生資環、[2]日本ハム株式会社中央研究所、[3]九大院・農院）
○Yuka SUGIHARA[1], Keishi KADOOKA[2], Yoshinori KATAKURA[3] ([1]Grad. Shc. Biores. Bioew. Sci., Kyushu Univ., [2]R&D Center, NH Foods Ltd., [3]Fac. Agri., Kyushu Univ.)

【背景・目的】

近年、脳と腸が密接に関わり影響を及ぼし合う「脳腸相関」という概念が注目されている。当研究室ではこれまでの研究で、食肉成分であるカルノシンが認知機能改善効果を示し、脳腸相関活性化能を有することを明らかにしている。そこで本研究では、カルノシンによる脳腸相関活性化の分子基盤としてエクソソームを想定し、その寄与を明らかにすることを目的として研究を行った。

【材料・方法】

腸管モデル細胞として、ヒト結腸がん由来細胞株である Caco-2 細胞を用いた。カルノシン処理をした Caco-2 細胞の培養上清から、ExoQuick-TC 及び MagCapture を用いてエクソソームを単離した。エクソソーム内 miRNA については、GeneChip miRNA 4.0 Array を用いて網羅的発現解析を行った。エクソソームの機能性は、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を用いて、神経突起伸長を指標に評価した。神経突起は、Milli-Mark Pan Neuronal Marker を用いて免疫染色を行い評価した。

【結果・考察】

カルノシン処理をした Caco-2 細胞由来のエクソソーム miRNA の網羅的発現解析を行った結果、カルノシン処理により発現変動を示す 37 種類の miRNA を同定した。これら miRNA のターゲット遺伝子を TargetScan により予測したところ、神経伝達物質の分泌・輸送、ニューロンの発達・分化、軸索の誘導等の神経細胞の分化・成熟に関わる遺伝子が多く含まれていることが明らかとなった。さらに、カルノシン処理した Caco-2 細胞由来のエクソソーム（Exo-Car）の機能性を評価した。まず、PKH26 標識した Exo-Car が SH-SY5Y 細胞に取り込まれていることが、共焦点レーザー走査型顕微鏡（TCS SP8）観察により明らかになった。さらに、Exo-Car 処理した SH-SY5Y 細胞では有為に神経突起の伸長が増強されていることが確認された。
以上の結果から、カルノシンは、機能的エクソソームの分泌を通じて脳腸相関を活性化し、脳機能改善効果を発揮しているものと考えることができた。

carnosine, exosome, gut-brain interaction

講演番号：3A06a08
講演日時：3 月 19 日 11:15～ A 校舎 06 会場

# アンセリン投与によるアルツハイマー病モデルマウスの記憶機能改善効果について

# The effect of Anserine on memory function in a mouse model of Alzheimer's disease

○塩谷 秋子、金子 順、久恒 辰博（東大新領域）
○Akiko ENYA, Jun KANEKO, Tatsuhiro HISATSUNE (Tokyo Univ.)

**【序論】**近年、高齢化に伴い認知症患者の増加が社会的な問題となっている。認知症の最大の危険因子は加齢であり、高機能食品成分によって脳の機能老化を改善し、ひいては認知症を予防する事に期待が寄せられている。当研究室では、高齢者を対象としたランダム化介入試験を行い、鶏肉イミダゾールジペプチド（アンセリン：カルノシン= 3：1、1 日あたり 1 g を 3 ヶ月以上摂取)に高齢者の記憶機能を改善する効果があることを見出してきた。作用機構の解明に取り組み、摂取後の血中動態試験の結果から、2 種類あるペプチドの中で、アンセリンが作用分子である可能性が推定された。そこで本研究では、アンセリンの効果を確かめるために、筋肉中にアンセリンのみ（約 0.5 g/100 g 可食部の湿重量）を含む鮭から高純度精製したアンセリン粉末を使用した。このアンセリンを記憶障害が生じた生後 18 ヶ月令のアルツハイマー病モデルマウスに投与し、その記憶機能障害ならびに神経炎症に対する改善作用を評価した。

**【方法】**アルツハイマー病モデルマウスとして 2 種類の原因遺伝子(*APP*/*PSEN1*)を組み込んだマウス、及び野生型マウスを使用した。各マウスが 18 ヶ月令以上になった後、2 ヶ月間アンセリン（2 g/L：鮭より製造、東海物産製、純度 93 %）を飲水瓶より投与した。コントロール群には水のみを摂取させた。記憶機能の評価としてモリス水迷路試験を用いた。Training を 5 日間行い、6 日目に Probe test を行う事で空間記憶機能を評価した。記憶試験の後、灌流固定を行い、脳切片を作成した。神経炎症マーカーである GFAP、Iba1 抗体を用いて免疫染色を行い、脳内の神経炎症の程度を比較評価した。

**【結果】**モリス水迷路試験の結果、通常の水のみを与えたアルツハイマー病モデルマウスと比較し、アンセリンを投与したアルツハイマー病モデルマウスでは、記憶機能の低下が有意に抑えられていることが示された（$n \geqq 8$, $p<0.05$）。このアンセリンを与えたアルツハイマー病モデルマウスの記憶機能は、野生型マウスと同程度であることも示された。また、脳組織評価（免疫染色）の結果、コントロール群と比べ、アンセリン群では脳内の炎症反応が顕著に抑制されていることがわかった。

**【考察】**アルツハイマー病モデルマウスにおいて、鮭由来アンセリンの投与によって記憶機能の障害が改善された。また、脳内の炎症反応も抑制されていた。アンセリンは、脳内に生じた神経炎症を抑制することを介して、脳機能の低下を改善する事が示唆された。

Alzheimer's disease, Anserine, inflammation

講演番号：3A06a09
講演日時：3 月 19 日 11:30～ A 校舎 06 会場

# 鶏肉イミダゾールジペプチドの高齢者の脳老化改善に対する効果

# Effect of chicken imidazole dipeptide on cognitive functions of elderly people

○谷川 輝虎[1]、丁 瓊[1]、金子 順[1]、戸塚 護[2]、片倉 喜範[3]、今林 悦子[4]、松田 博史[4]、久恒 辰博[1]
([1]東大新領域、[2]東大農、[3]九大農、[4]国立精神神経医療研究センター)
○Kitora Tanigawa[1], Kei Tei[1], Jun Kaneko[1], Mamoru Totsuka[2], Yoshinori Katakura[3], Etsuko Imabayashi[4], Hiroshi Matsuda[4], Tatsuhiro Hisatsune[1] ([1]Univ of Tokyo., [2]Univ of Tokyo, [3]Kyushu Univ., [4]NCNP)

**【序論】**我々はこれまでに鶏肉から抽出したイミダゾールジペプチド含有食品に中高齢者の脳老化を改善するはたらきがあることを明らかにしてきた（Rokicki et al. 2015, Hisatsune et al. 2016)。脳老化は加齢に伴い段階的に進行することが知られている。また、疫学調査の結果から、脂質代謝に関係する ApoE 蛋白質のアレルの一つである ApoE4 を持つ高齢者は、認知症を発症するリスクが有意に高い事が明らかとなっている。鶏肉イミダゾールジペプチドによって、ApoE4 を持つ高齢者の脳老化を改善することができれば、認知症予防に繋がる可能性がある。そこで今回、これまでに行った中高齢者参加のヒト試験データを用いて、高齢者に限定し、かつ ApoE4 遺伝子保有者を抽出した層別解析を行った。

**【方法】**試験食として、鶏肉より抽出しアンセリンとカルノシンを３対１で含む試験食（日本ハム製）を使用した。被験者の方には、試験食あるいはプラセボ食を１日１ｇ、12 ヶ月間摂取して頂いた。イミダゾールジペプチドの効果を評価するために、各種の心理機能検査と MRI の撮影を試験食摂取直前、試験食摂取 12 ヶ月後に行った。MRI 法として脳内の血流動態を調べるために ASL(Arterial Spin Labeling)を、脳内の神経炎症の程度を調べるために DTI(Diffusion Tensor Imaging)を用いた。また、血液サンプルを用いて、ApoE 遺伝子アレルの同定を行った。本研究では、平成２６年より２７年にかけて実施した１２ヶ月間摂取試験の全被験者データから、６５歳以上の高齢被験者のデータを抽出し（試験食群：３１名、プラセボ食群：３７名)、各種の統計解析を実施した。

**【結果】**６５歳以上の高齢者において、イミダゾールジペプチドを 12 ヵ月間摂取することで、言語性記憶に関係する WMS-LM(Wechsler Memory Scale-Logical Memory)のスコアが改善された（$p<0.05$)。MRI の撮像法の一つで脳内の血流量を評価する ASL の結果から、前頭葉と海馬の血流が改善されることが見出された（$p<0.05$)。さらに、ApoE4 保有高齢者において（試験食群：８名、プラセボ食群：４名)、DTI データを用いた画像統計解析（$p<0.05$）の結果から、イミダゾールジペプチドの摂取によって、前頭葉の中でも言語記憶に深く関わるブローカ野周辺の神経炎症の程度が、有意に改善されていることが示唆された。

**【考察】**イミダゾールジペプチドは、認知症リスク遺伝子 ApoE4 を保有する高齢者の脳老化を、より効果的に改善し得る可能性が考えられた。

Imidazole dipeptide, Alzheimer's disease

講演番号：3A06a10
講演日時：3 月 19 日 11:45～ A 校舎 06 会場

睡眠の質改善素材：清酒酵母による肌質改善作用とそのメカニズム解析
The Effect of Sake Yeast on Skin Condition
○永盛 友樹[1]、岡 謙吾[1]、物井 則幸[1]、岩本 拓[1]、尾林 裕子[1]、翠川 辰行[1]、村越 倫明[1,2]、内山 章[1]、裏出 良博[3]([1]ライオン(株)、[2]京都府立医科大、[3]筑波大 WPI-IIIS)
○Yuki Nagamori[1], Kengo Oka[1], Noriyuki Monoi[1], Taku Iwamoto[1], Yuko Obayashi[1], Tatsuyuki Midorikawa[1], Michiaki Murakoshi[1,2], Akira Uchiyama[1], Yoshihiro Urade[3] ([1]Lion Corporation, [2]Kyoto Pref. Univ. of Medicine, [3]WPI-IIIS, Univ. of Tsukuba)

【背景および目的】
我々は、清酒酵母に睡眠の質向上機能（深睡眠の指標：デルタ波パワー値の増加、成長ホルモン(GH)分泌量の増加、起床時の眠気の低下）を確認している(Monoi *et al*, J Sleep Res.2016)。睡眠の質と肌質には正の相関が、GH にはヒトの肌のコラーゲン量を増加させることが報告されている。これらの背景から、本研究では、清酒酵母を摂取することで、肌質が改善されるかどうかをヒト試験にて検討し、さらに、メカニズム解析として GH が肌質関連因子に与える影響を *in vitro* 試験で検証した。
【方法】
①ヒト試験：睡眠に一定の不満を抱える健常成人計 20 名(男性 14 名、女性 6 名、平均年齢:34.5±9.1)を対象に、被験食品(清酒酵母粉末 500mg/日)、または対照食品を就寝 1 時間前に 5 週間摂取させる二重盲検並行群間試験を実施した。評価は試験食摂取前、摂取 5 週間後に実施し、その差を統計解析に用いた。主評価項目として、吸収法により頬の弾力性を示す回復率(R2)、瞬間的回復率(R7)、超音波画像解析法により頬のコラーゲン密度を評価した。副次評価として、経皮膚水分蒸散量や OSA 睡眠調査票による睡眠感の評価も行った。
②*in vitro* 試験：播種 24 時間後の培養ヒト皮膚線維芽細胞に、GH またはその下流で分泌されるインスリン様成長因子(IGF-1)を（各々0.5, 5, 50 ng/mL）を添加した。添加 24 時間後に total RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR 法により肌質関連因子の遺伝子発現変動を解析した。
【結果】
①ヒト試験：試験食摂取前、摂取 5 週間後の変化量を対照食品群と比較した結果、清酒酵母群では頬の弾力性を示す回復率($p<0.01$)、瞬間的回復率($p<0.01$)およびコラーゲン密度($p<0.05$)が有意に増加した。また、清酒酵母摂取により経皮水分蒸散量（$p<0.1$)、睡眠感($p<0.05$)にも改善がみられた。
②*in vitro* 試験：GH および IGF-1 の添加によりヒアルロン酸合成酵素、IGF-1 の添加によりコラーゲン前駆物質の発現量が用量依存的かつ有意に増加することが認められた（$p<0.05$)。
【結論】
清酒酵母は、睡眠の質を向上させることに加えて、肌質(弾力性、コラーゲン密度)を改善させることが明らかとなった。さらに、深睡眠時に分泌される GH、および GH 下流の IGF-1 によりコラーゲンなどの肌質関連因子の発現が上昇することを見出した。

sleep, skin, sake yeast

講演番号：3A06p01
講演日時：3 月 19 日 14:00～ A 校舎 06 会場

# 各種の湿熱処理玄米の物理化学特性の評価

# Evaluation of physico-chemical properties of high-moisture treated brown rice

○中村 澄子[1]、奥村 寿子[2]、菅原 正義[2]、大坪 研一[1] ([1]新潟薬大応用生命、[2]長岡高専)
○Sumiko NAKAMURA[1], Hisako OKUMURA[2], Masayoshi SUGAWARA[2], Kenichi OHTUBO[1] ([1]Niigata Univ. P.A.L.S., [2]NagaokaCT)

【目的】

従来、菅原らにより、湿熱処理によって米の機能性が増すことが報告されている[1)]。本研究では、高アミロース米や色素米など各種の玄米の湿熱処理による物性および機能性成分の測定を行い、各種の玄米の最適湿熱処理条件を探索することを目的とした。

【方法】

試料として、越のかおり（高アミロース米)、こしいぶき（一般米)、紫宝（色素米）を使用し、長岡高専菅原研究室において各種の条件（未処理、0.1MPa で 5 分、0.1MPa で 10 分、0.2MPa で 5 分、0.2MPa で 10 分、0.3MPa で 5 分、0.3MPa で 10 分）で湿熱処理を行った。糊化特性は RVA、ゲル物性はテンシプレッサーにより測定した。α―アミラーゼ活性及び難消化性デンプン含量（RS）はメガザイムキットにより、色差はミノルタ製色差計により、抗酸化性はマイクロプレートによる ORAC 値（Trolox 換算）として測定した。

【結果】

高アミロース米「越のかおり」の各湿熱処理の中で、RVA による最高粘度、最終粘度、糊化開始温度が未処理の値とほぼ変化しなかった条件は「0.1MPa で 10 分」の処理であった。0.2MPa 及び 0.3MPa 処理では、これらの値が低下し、糊化状態と類似した結果となった。ゲル物性の点では、Toughness（H5/H1）が未処理より低い場合は、糊化が開始したと推定され、Toughness が未処理より高い値を示した「0.1MPa で 5 分」及び「0.1MPa で 10 分」の処理が有望な条件と推定された。この条件の湿熱処理では、色差の YI 値及び b 値が未処理より約 1.5%高くなり、α―アミラーゼ活性は、60%減少し、RS 含量は約 1.1 倍に増加し、アミロース含量は僅かに増加した。この処理条件の場合、RS は、グルコース含量と負の相関（r = - 0.9)、糊化特性のコンシステンシー及び最終粘度と正の相関（r = 0.94、0.88）を示し、α―アミラーゼ活性は L-ORAC と 0.90、H-ORAC と 0.77 の正の相関を示した。湿熱処理による脂質の変化についても検討を加えた。

１）菅原正義：高アミロース米の湿熱処理による改質, 食品工業, 57(2), 51-56, 2014.

rice, high-moisturee treatment, physico-chemical properties

発表責任者：大坪研一（ohtsubok@nupals.ac.jp）

講演番号：3A06p02
講演日時：3 月 19 日 14:15～ A 校舎 06 会場

# 抗体を用いた残存糠層検出技術の開発

# Method for detecting residual bran on grains with antibodies

○大倉 哲也[1]、藻寄 茜[2]、峯岸 恭孝[2]、織田 健[3]、岩下 和裕[3]([1]農研機構　食研、[2]ニッポンジーン、[3]酒類総研)
○Tetsuya OOKURA[1], Akane Moyori[2], Yasutaka Minegishi[2], Ken Oda[3], Kazuhiro Iwashita[3] ([1]National Food Research Institute, [2]Nippon Gene, [3]National Research Institute of Brewing)

【目的】大麦や酒米における糠の残存は、押麦や日本酒の品質にとって重要な問題である。しかしながら新 MG 法やその改良法では、70%以下では熟練者でも判別が困難な状況にあり、新たな判別法が望まれている。演者らはデンプン分解酵素群に対する抗体を用いて穀物内の抗原分布を精査する過程で、胚乳内の成熟デンプン粒に比べて糠層内の未成熟なデンプン粒をより強く認識・検出する抗体を見出した。本研究では、搗精度の異なる大麦において残存する糠をこれら抗体により高感度で再現性良く検出する方法を検討し、新たな残存糠層の評価法の確立を目指した。
【方法】搗精度の異なる（90, 85, 75, 65, 60%）H27 年度埼玉県産もっちりぼし（永倉精麦株式会社より供与）を４％パラホルムアルデヒドで固定後 PBS で洗浄し、ブロッキングバッファー（Roche）でブロッキングした。PBS で洗浄後、モノクローナル抗体（0.1~10 μg/ml）と一晩反応させ、HRP-標識 2 次抗体と 30 分間反応させた。洗浄後、whole-mount ELISA の際には TMB（Nacalai）で 30 分間反応後 1 M リン酸で反応停止し、450 nm で吸光度を測定した。whole-mount 染色の際には、DAB/$H_2O_2$(Sigma/Junsei Chemical)と反応させ、リン酸で反応を停止後、実体顕微鏡（AFZ-50：キーエンス）で画像を取得した。酒米は酒蔵から供与いただいたものを大麦と同様に処理し観察した。
【結果】60%精麦歩合でネガティブコントロールとの差を whole-mount ELISA で再現性良く明確に得るために必要な抗体濃度は各抗体で異なっていたが、搗精度の異なる大麦での吸光度（450nm）と搗精歩合との間には正の相関が認められた。また whole-mount 染色時に、背側等の糠が残りやすいとされている部位が着色したことから、各抗体が残存する糠層を検知していることが示唆された。本評価法を製造等の現場で利用するために、今後は固定及び抗体反応時間の短縮等の技術開発を進める予定である。

antibody, residual bran, grain

発表責任者：大倉哲也（ookura@affrc.go.jp）

講演番号：3A06p03
講演日時：3 月 19 日 14:30～ A 校舎 06 会場

# 炊飯米を利用した高濃度ゲルの硬化過程に及ぼす品種特性の影響

# Effects of rice cultivar characteristics on the process of hardening of gels prepared from cooked rice

○佐々木 朋子、松木 順子、與座 宏一、杉山 純一、前田 英郎、重宗 明子、安東 郁男、徳安 健（農研機構）
○ Tomoko Sasaki, Junko Matsuki, Koichi Yoza, Junichi Sugiyama, Hideo Maeda, Akiko Shigemune, Ikuo Ando, Ken Tokuyasu (NARO)

【目的】米の新たな利用法として、炊飯米に撹拌せん断処理を行うことによって、ユニークな物性を示す食品素材としてのゲルを調製できる技術が見出された[1)]。ゲルの保存時における硬化は、ゲルを利用した加工食品等の品質に影響を及ぼすため、食品の品質向上を目的とした硬化の制御要因の解明は重要な課題である。本課題では、高アミロース品種の炊飯米を使用して、炊飯時の加水率と米の品種特性がゲルの硬化過程に及ぼす影響について検討した。
【方法】やや高アミロースを含む高アミロース米 7 品種系統の精白米について、加水量（米重量に対して 2、3、4 倍量）を変えて約 100℃で 30 分間加熱することによって炊き上げた炊飯米を調製した。炊飯米は 25 および 75℃の恒温槽に 30 分間放置した後、エクセルオートホモジナイザー（(株）日本精機株式会社）を用いて撹拌せん断処理を行った。撹拌せん断処理を行った試料は成型した後、4℃で 1 時間、1、3、5 日間保存した。テクスチャーアナライザーを用いてゲルの圧縮・破断荷重値を測定し、荷重値の経時変化を品種間で比較した。また、各品種の炊飯米についても 25 および 75℃の恒温槽に 30 分間放置した後、1 粒の硬さを測定した。
【結果】撹拌せん断処理を行う前の試料温度の影響はいずれの加水量でも同様の傾向を示し、すべての品種について 25℃よりも 75℃保存時のゲルが硬くなり、硬化速度が速くなる傾向が見られた。各品種から調製したゲルの硬化過程には加水量の違いが顕著に反映されており、加水量の増加によりゲルの硬化が緩やかになった。米品種間の硬化過程の違いは、いずれの加水量においてもほぼ同様の傾向を示したが、品種によっては加水量の違いによって異なる挙動を示した。3 倍および 4 倍加水量のゲルでは、他の品種に比べて明らかに柔らかく、硬化も緩やかな品種については、2 倍加水量のゲルを調製した際には他の品種との圧縮荷重値および硬化速度の差が減少した。一方で、2 倍および 3 倍加水量のゲルでは他の品種より硬化が極めて急速に進行する品種については、4 倍加水では硬化が緩やかになり、他のゲルの硬化と類似のパターンを示した。これらの結果から、ゲルの硬化過程に反映される品種特性は加水量によって異なる可能性が示唆された。また、3 種類の加水量で調製したゲルの物性値とアミロース含量およびアミロペクチンの側鎖長分布、さらには炊飯米 1 粒の硬さとの関連性について解析を行った。
1)杉山純一ら、特開 2013-70663

rice, gel, cultivar

講演番号：3A06p04
講演日時：3 月 19 日 14:45～ A 校舎 06 会場

Effects of modified starches on product quality of prawn crackers produced by the drying process.
○ Chatchai WATTANAPHAIROJ, Doungjai THIRATHUMTHAVORN, Prasong SIRIWONGWILAICHAT, Eakaphan KEOWMANEECHAI (Silpakorn Univ.)

Prawn cracker is a snack that popularly consumed in Southeast Asian countries. Generally, aging of cooked dough in cold room is an important step for accelerating starch retrogradation. Except this step, the cooked dough cannot be sliced due to the stickiness to cutting blade. Importantly, energy consuming and a long time for processing are also disadvantages of cold incubation step. From preliminary studies, it was found that prawn cracker can be prepared by drying the cooked dough at 70 degree Celsius for 30 minutes (called DP Cracker). Anyway, DP cracker has inferior qualities (rough surface and hard texture) than conventional cracker prepared using the above method (CP cracker). Therefore, the incorporation of modified starches including pregelatinized starch (PREGEL), oxidized starch (OX-starch) and 1:1 mixed of pregelatinized starch and oxidized starch (PREGEL+OX-starch) affecting on the qualities of cracker was studied. DP cracker containing PREGEL presented smooth surface as found in CP cracker. Additionally, bulk density and crispness of that sample were not significantly different ($p \geq 0.05$) from those of CP cracker. While, DP cracker containing OX-starch and PREGEL+OX-starch presented rough surface. Hardness measured by texture analyzer of all DP crackers containing modified starch were not significantly different ($p \geq 0.05$). Interestingly, DP Cracker containing PREGEL obtained the highest sensory scores in all attributes evaluated by 9-Point hedonic scale. In conclusion, prawn cracker could be prepared by drying the cooked dough instead of aging in a cold room. The incorporation of PREGEL for preparing prawn cracker by drying process was recommended.

prawn cracker, modified starch, retrogradation

発表責任者：Doungjai Thirathumthavorn（thdoungjai@yahoo.com）

講演番号：3A06p05
講演日時：3 月 19 日 15:00～ A 校舎 06 会場

# Comparison of release behavior of flavor encapsulated in *Saccharomyces cerevisiae* and maltodextrin powder

○Afroza SULTANA[1,2,3], Yusuke TANAKA[4], Yoshiya FUSHIMI[4], Hidefumi YOSHII[1,2] ([1]Ehime Univ., [2]Kagawa Univ., [3]Chittagong Veterinary and Animal Sciences Univ., [4]Fuji Foods Corp.)

【Purpose】Flavors play a vital role in the food industry to satisfy consumer. Because of harsh processing in food industry it is very important to encapsulate flavor. Encapsulation process can protect the volatility, increase the stability during processing and improve the handleability. Encapsulation of flavors are done by physical methods such as spray drying or freeze drying, chemical methods such as molecular encapsulation and cell methods such as using yeast cells. Recently, yeast cells were noticeable in the encapsulation of different food ingredients as natural micro-vesicle. Therefore, the focus of the study was to investigate release and stability of flavor (*d*-limonene and ethyl hexanoate) in yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*) and maltodextrin powder.

【Materials and Methods】The beta-glucan extracted drum dried yeast cells and MD (DE 19) were used as wall material. Encapsulation was done by incubating yeast cells with water and flavor at 220 rpm shaking speed at 40ºC for 4 h and spray dried (Ohkawara L-8 Spray Dryer) at the inlet air temperature 160ºC. For making MD powder, MD (DE 19), sodium caseinate and water were mixed properly and homogenized at 8000 rpm for 3 min using polytron homogenizer. The encapsulated flavor in the yeast was measured with hexane extraction using 20 mg yeast powder and distilled water. For extraction of flavor from the MD powder, 50 mg powder was mixed with distilled water and hexane and heated at 90ºC. After centrifugation, the supernatant of hexane phase was used to determine the flavor content by using gas chromatography with a flame ionization detector. For investigating the release behavior; 40, 60, 80 and 105ºC temperature were used with water (50%, 100%, 200%) and without water in the powder.

【Results and discussion】Encapsulation efficiency (the retention) of *d*-limonene or ethyl hexanoate in yeast was obtained as 33 and 56% respectively. In MD powder, the retention of *d*-limonene was 83%. Without addition of water, flavor could not release significantly from yeast cells at 105ºC. But even little drop of water, the yeast cells could release flavor. Release rate from yeast cells could be estimated by the first-order Gaussian distribution of activation energy. The activation energy for release of ethyl hexanoate and *d*-limonene from yeast was 55 and 49 kJ/mol respectively. Formation rate of limonene oxide in yeast was slower than that of emulsified MD powder.

release, flavor, *Saccharomyces cerevisiae*

発表責任者：Hidefumi YOSHII（foodeng.yoshii@ag.kagawa-u.ac.jp）

講演番号：3A06p06
講演日時：3 月 19 日 15:25～ A 校舎 06 会場

Physical stability of squalene oil in spray-dried powder

○Asmaliza ABD GHANI[1,2,3], Hirokazu SHIGA[4], Shuji ADACHI[5], Hidefumi Yoshii[1,2] ([1]Ehime Univ., [2]Kagawa Univ., [3]Univ. Sultan Zainal Abidin, Malaysia, [4]Kyoto Gakuen Univ., [5]Kyoto Univ.)

[PURPOSE] Encapsulation of polyunsaturated fatty acids (PUFA) by spray drying was investigated to form stable oil powder. Squalene oil (SQ) is useful model for PUFA because a high purity, low cost and can me analyzed using gas chramotography. The suitable blend of wall materials in oil in water emulsions properties needed in spray drying. SQ and maltodextrin (MD, dextrose equivalent=19) were used as a core model and wall materials. In this study, the effect of sodium caseinate content as emulsifier and oil-droplet diameter in spray-dried powder were investigated. SQ powder stability was determined for 28 days at three different temperatures.

[MATERIALS AND METHODS] Spray-dried emulsions were prepared with SQ, 3, 5 and 8 wt% sodium caseinate (NC), MD, lecithin as 40 wt% solid content and 60 wt% distilled water. Emulsions were prepared with two-step homogenization, pre-mixed with a Polytron homogenizer (PT-6100, Kinematica) for 3 min at 8000rpm followed by a high-pressure homogenizer for two cycles either using a (LAB 2000 SMT) at 20 MPa and a Starburst Mini (HJP-25001K, Sugino) for pressure at 100 MPa. Reconstituted oil-droplet size in powder and particle size distributions were measured with laser diffraction particle analyzer (Shimadzu SALD-7100). SQ powders were kept at 105, 70 and 50 °C in drying ovens. Surface oil and were measured by extraction of SQ in dispersing 0.1 g of powders with hexane and total oil with dimethyformamide (DMF) and hexane. Samples were analyzed by GC-FID (Shimadzu 2010).

[RESULTS AND DISCUSSION] Larger oil droplet size of encapsulated powder was stable at 50°C and smaller oil droplet had lower degradation at 105°C. SQ degradation behavior in spray-dried powder was calculated using the first order reaction. The activation energy value was highest about 67 kJ/mol for larger oil droplet size powder with 5 wt% of NC and lowest 25 kJ/mol for smaller oil droplet size with 8 wt% of NC. The activation energy for pure SQ was obtained about 22 kJ/mol using the autocatalytic reaction rate. These activation energy and logarithm frequency factor could be correlated.

squalene oil, spray-dried powder, degradation rate

発表責任者：Yoshii Hidefumi（foodeng.yoshii@ag.kagawa-u.ac.jp）

講演番号：3A06p07
講演日時：3 月 19 日 15:40～ A 校舎 06 会場

コンブ類における不溶性および水溶性食物繊維の分別分析
Analysis of insoluble and soluble dietary fiber in *Laminariaceae*.
○高谷 直己[1]、紙谷 年昭[1]、戸田 登志也[1]、青江 誠一郎[2] ([1]フジッコ株式会社、[2]大妻女子大)
○Naoki TAKATANI[1], Toshiaki KAMITANI[1], Toshiya TODA[1], Seiichirou AOE[2] ([1]Fujicco Co., Ltd., [2]Otsuma Women's Univ.)

【目的】
七訂日本標準食品成分表（2015）には、藻類に関してのみ、不溶性食物繊維（IDF）と水溶性食物繊維（SDF）の記載がなく、総量（TDF）のみが記載されている。これは、藻類には粘質多糖類が多く、分析の際の IDF と SDF とのろ過分別が困難であることが理由とされている。本研究では、Prosky 法に準じた分別分析において、リン酸バッファーと MES-TRIS バッファーを使用した場合の比較を行った。
【方法】
試料として、マコンブ（2014 年産尾札部 1 等）、ガゴメコンブ（2009 年産椴法華 1 等）、ナガコンブ（2014 年産浜中 2 等）を用いた。食物繊維の分別分析は、AOAC 公定法である Prosky 法に準じ、リン酸バッファーまたは MES-TRIS バッファーを用いた。また、宇田川らの方法 [1)]に準じて、IDF および SDF に含まれるアルギン酸量をカルバゾール硫酸法により測定した。
【結果】
IDF と SDF のろ過分別の際、リン酸バッファーでは、いずれのコンブも 60 分のろ過では、全てのろ液を回収することができなかった。一方、MES-TRIS バッファーでは、いずれのコンブでもろ過は 45 分以内に終了した。また、MES-TRIS バッファーにて IDF および SDF 値を測定したところ、マコンブ（IDF, SDF= 24%, 5%（原藻乾重量当り））、ガゴメコンブ（IDF, SDF= 23%, 5%）、ナガコンブ（IDF, SDF= 23%, 8%）となった。一方、リン酸バッファーでのろ過分別に際して、ろ過助材の増量により強制的にろ液を回収し、IDF および SDF を測定したところ、マコンブ（IDF, SDF= 10%, 21%）、ガゴメコンブ（IDF, SDF= 8%, 21%）、ナガコンブ（IDF, SDF= 12%, 19%）となり、MES-TRIS バッファーを用いた場合と異なり、いずれのコンブにおいても SDF が IDF よりも多くなった。さらに、マコンブについてそれぞれの IDF および SDF に含まれるアルギン酸量を測定したところ、MES-TRIS バッファーでは、IDF に 12%（原藻乾重量当り）、SDF に 3%のアルギン酸が検出された一方で、リン酸バッファーでは IDF に 1%、SDF に 13%のアルギン酸が検出された。以上より、コンブ類の食物繊維は、測定で用いるバッファーにより IDF と SDF 値が大きく変化し、その要因の一つはアルギン酸の挙動によるものと考えられた。
1) 宇田川ら「新規アルギン酸定量法の開発」日本食品科学工学会誌 **60**, 654-660 (2013)

Insoluble and Soluble dietary fiber, *Laminariaceae*, Prosky method

発表責任者：高谷直己（n-takatani@fujicco.co.jp）

講演番号：3A06p08
講演日時：3 月 19 日 15:55～ A 校舎 06 会場

乳酸発酵工程の数値化に関する研究
Research on expressing in numerical form of lactic acid fermentation process
○豊嶋 瑠美子、森 大輝、中嶋 奎太、大木 梓織、石川 匡子、張 菡、陳 介余、秋山 美展（秋田県立大学)
○Rumiko TOYOSHIMA, Daiki MORI, Keita NAKASHIMA, Shiori OHKI, Kyouko ISHIKAWA, Kan CHOU, Kaiyo CHIN, Yoshinobu AKIYAMA (Akita Prefectural University)

【目的】発酵乳等の製造においては、工程管理の指標として発酵乳の酸度測定がなされる．酸度を経時的に測定することによって酸度－時間曲線が得られるが，この曲線は用いる乳酸菌種，発酵温度，基質濃度等の種々の要因によって異なった曲線になることが知られている．これらの発酵曲線の多くはシグモイド関数によって近似でき，酸度の経時的変化をある範囲内で予測可能である．われわれは、更にこれらの酸度上昇曲線を相互に比較検討することを目的として酸度上昇曲線の微分解析を試みた．

【方法】明治おいしい牛乳（株式会社明治）を基質とし，LKM512 菌（協同乳業株式会社)、ABCT 菌、ケフィア菌（タニカ電器株式会社)、カスピ海菌（(株）リジェールドーレ RD）を用いて発酵乳を作製した．発酵温度は、LKM512、ABCT 菌が 39℃、42℃、45℃、48℃とし、ケフィア、カスピ海菌が 24℃、27℃、30℃、33℃とした。発酵工程の 0-72 時間の間にサンプリングし、酸度滴定を行った。酸度上昇曲線を作成し、Origin Pro 8J を使用して微分解析を試み、酸度上昇曲線を相互に比較検討した。

【結果】酸度上昇曲線をシグモイド関数によって近似し，一次および二次微分曲線を得た．一次微分曲線の極大点出現時間は発酵工程における乳酸生成速度の最大点（変曲点）であり，二次微分曲線の極大と極小点はそれぞれ対数増殖期の開始期と終了期に附合することが確認された．LKM512 菌では発酵温度が高くなるにつれて変曲点と対数期の開始時間が早くなり，さらに対数期も短くなる傾向であった．ABCT 菌では、発酵温度が高くなるにつれて 42℃までは変曲点はあまり差がなく対数期の開始時間は遅くなるが，45℃以上では変曲点および対数期開始時間には差が見られなかった．ABCT 菌の至適温度は 42℃付近で、ほかの種菌よりも至適温度の範囲が狭い可能性が示唆された。ケフィア菌では、発酵温度が高くなるにつれて、変曲点および対数期開始時間は早くなるが、対数期は 24℃で最も長く、27℃と 30℃では短くなり、発酵が進んでいることを示している。しかし、33℃では対数期が長くなり、発酵はゆるやかに進んでいる。このことから、ケフィアの至適温度は 27-30℃である可能性が示唆された。カスピ海菌では、変曲点は 27℃で最も遅く、30℃、33℃ではやや早くなるが、対数期の開始時間に差はなく，対数期は 27℃で最も長く，30℃および 33℃では短くなった。以上のように 4 種の乳酸菌の発酵工程における酸度上昇曲線を微分解析することにより酸度上昇曲線の特徴を数値表現することができるものと思われる．

lactic acid, fermentation, numerical form

講演番号：3A06p09
講演日時：3 月 19 日 16:10～ A 校舎 06 会場

# 小麦粉代替ドウによるメイラード反応の検討とその評価

# Examination and the evaluation of the Maillard reaction by dough which replaced with cyclodextrin

○小木曽 加奈[1]、寺尾 啓二[3]、古根 隆広[3]、岡崎 光雄[2]([1]長野県短大生活科学、[2]岡崎酒造（株)、[3]（株）シクロケムバイオ)
○Kana KOGISO[1], Keiji TERAO[3], Takahiro FURUNE[3], Mitsuo OKAZAKI[2] ([1]Nagano Pref. Col., [2]Okazaki Brewery Co., [3]CycloChem Bio Co., Ltd.)

【目的】

発芽玄米酒粕とは発芽玄米を使用して作成した清酒の残さである。我々は糠や胚芽や胚乳などの産業廃棄物の排出を抑えること、また廃棄物再利用の面から発芽玄米酒粕の有効利用方法を検討してきた[1)]。我々は製パン時に発芽玄米酒粕を 10%添加した場合、パンの「コク味」の増強、または「塩味」の増強傾向を見いだした。これらの呈味増強には有機酸が関与していることがわかった[2)]。一方、有機酸が焼成されないとこれらの増強はなされない。そのため、１、代替ドウ系のメイラード反応系統を開発、検討することによって、２、有機酸による呈味増強効果を調べることを目的とした。

【方法】

代替ドウ系メイラード反応系統の検討方法として以下のように行った。まず、水系と異なり、100℃以上の加熱など、製パンと同様のことができるよう、ドウ中の小麦粉代替物としてα‐シクロデキストリンを使用した。今回はα‐シクロデキストリンと水を加え懸濁したものをブランクとし、そこにグルコースとグリシンを加えた系をコントロールとした。発芽玄米酒粕ならびに同様の製法を行っている清酒吟醸粕から検出された有機酸について、それぞれコントロールに加え、加熱したものの官能試験を行った。

【結果と考察】

α‐シクロデキストリンを使用した代替ドウ系メイラード反応系統は 100℃以上での焼成が可能であり、焼成後、これら粉末・固形物として評価が可能になった。また、各種有機酸による呈味の変化が認められた。

なお、本研究は科研費（26750033）の助成を受けたものである。

1) 発芽玄米酒粕の食品利用方法についての検討，牛越 静子，小木曽 加奈，長野県短期大学紀要、第 65 号，13-18（2010）
2) 発芽玄米酒粕中の有機酸がパンの呈味に及ぼす影響，小木曽加奈，中澤弥子，吉岡由美，佐藤晶子，岡崎光雄，日本味と匂学会誌 20(3)，313-316（2013）

Maillard reaction, baking, solid

発表責任者：小木曽加奈（kf-kana@nagano-kentan.ac.jp）

講演番号：3A06p10
講演日時：3 月 19 日 16:25～ A 校舎 06 会場

# 小麦リポキシゲナーゼのグルテニンサブユニット中ポリペプチド構成に与える影響

# Effect of wheat lipoxygenase on polypeptides constitution in glutenin subunits

○浅水 一久[1]、佐藤 甫之[1]、白石 玲[2]、椎葉 究[1,2]([1]東京電機大学大学院、[2]東京電機大学)
○Kazuhisa ASAMIZU[1], Motoyuki SATOU[1], Akira SHIRAISHI[2], Kiwamu SHIIBA[1,2] ([1]Graduate School of Tokyo Denki Univ., [2]Tokyo Denki Univ.)

【目的】

小麦グルテニンの主成分であるグルテニンは、小麦の物性や加工性に大きな影響を与えている。グルテニンは、3 種のサブユニットから構成され、それぞれ高分子量・低分子量・会合性グルテニンサブユニット（HMW-GS・LMW-GS・AGGS）に分かれ機能や構造が異なっており、研究されている。小麦粉中の酸化酵素リポキシゲナーゼ（以下 LOX）は、活性メチレンを持つ不飽和脂肪酸を酸化し、ペルオキシドラジカルを発生させる。LOX により生産されたペルオキシドラジカルは、加工中グルテン中の SS 結合や水素結合、疎水結合などに影響を与え、グルテン高次構造の変化に影響を与え、その結果、製パン性を向上させる事が報告されている(1)。本件は、LOX により、最も感受性の高いグルテニンサブユニット区分とそのタンパク質成分を特定する事を目的とした。

【方法】

アセトン脱脂した小麦胚芽から粗酵素液を 50mM 酢酸緩衝液を用いて抽出後、硫安分画（30-40%）し、沈殿物を回収、10mM 酢酸緩衝液を添加、遠心分離、上清を粗 LOX 酵素液とした。

小麦粉 100ｇに対し 300U の LOX を添加し、65%の水を加えミキシングし、ピークタイム 5 分後の生地を凍結乾燥し、粉砕し、小麦粉試料の作製を行った。（コントロールは 65%加水のみ）

粉砕し再構成した小麦粉の試料は、50mM 酢酸水溶液（pH5.5）を用い、オズボーン分画法で、可溶性グルテニン・不溶性グルテニンの沈殿物を抽出後、メルカプト還元処理し、その後遠心分離した上清から、アルキル化可溶性と不溶性グルテニンを調整した。その後、DANNO らの方法により、HMW-GS・LMW-GS・AGGS に分画した。抽出した可溶性・不溶性グルテニンと分画区分は、タンパク質量と成分の比較を行なった。その後、SDS-PAGE 法により、構成するタンパク質成分を分布と測定を行なった。また、遊離 SH 基の測定を行い、各試料の SH 基の変化を観察した。

【結果および考察】

1. 不溶性グルテニンは、対象区と比較し LOX 添加粉（テスト区）において減少し、可溶性グルテニンは、増加する傾向にあった。
2. 可溶性と不溶性の量は、LMW-GS 区分が減少し、AGGS 区分は増加する傾向にあった。
3. 可溶性グルテニンの遊離 SH はテスト区分が増加し、不溶性グルテニンは、減少する傾向にあった。

(1) K.SHIIBA *et. al*, 1991. Purification and characterization of lipoxygenase isozymes from wheat germ, Cereal Chem. 68(2):115-122

lipoxygenase, aggregative glutenin subunit, low-molecular-weight glutenin subunit

講演番号：3A06p11
講演日時：3 月 19 日 16:50～ A 校舎 06 会場

組換えコムギ LOX2 の発現、精製および分析
Expression and purification of recombinant wheat lipoxygenase isozyme2.
○佐藤 甫之[1]、今村 未央[1]、浅水 一久[1]、白石 玲[2]、川崎 寿[2]、夏目 亮[2]、椎葉 究[2] ([1]東京電機大学大学院、[2]東京電機大学)
○ Motoyuki SATO[1], Mio IMAMURA[1], Kazuhisa ASAMIZU[1], Akira SHIRAISHI[2], Hisashi KAWASA[2], Ryo NATSUME[2], Kiwamu SHIBA[2] ([1]Graduate School of Tokyo Denki, [2]Tokyo Denki Univ.)

【目的】
コムギの酸化酵素であるリポキシゲナーゼ(LOX と以下略)には、少なくとも 3 種のアイソザイムが存在する。ドウを作製時に LOX を添加すると、酸化が促進され製パン性が改善されること[(1)]や二次加工中にグルテンの構造が変化すること[(2)]が報告されている。我々は、コムギ胚芽より部分精製した LOX をドウに添加した時の、ドウのグルテニン構造やミキシング中の抵抗幅の低下およびブレークダウンの減少など、生地物性の変化を確認した。その詳細な分子レベルでのメカニズムを解明する目的で、本研究では、小麦粉の二次加工中、リポキシゲナーゼがグルテニン構造に与える影響について解析する。今回、コムギ LOX のアイソザイムのうち、最も研究が進んでいるコムギ LOXⅡ（アイソザイム２）に着目し、組換え大量発現と精製、および組換えコムギ LOXⅡが製パン性へ与える影響の分析を試みた。
【方法】
大腸菌内での発現に適化した LOXⅡ遺伝子配列をコードする DNA を合成した。その遺伝子を PCR で増幅し、リコンビナーゼ反応を利用して pET-16b に組み込んだ。配列を確認後、大腸菌 BL21(DE3)を形質変換し、組換え LOXⅡ発現の条件を検討した。
【結果と考察】
転写を誘導する IPTG の添加量、組換え発現の温度、誘導時間等の条件を複数検討した。いずれの条件においても、組換え LOXⅡの過剰発現は認められたものの可溶性の蛋白質として回収することができず、不溶性画分にのみ分画された。そこで、不溶性画分に得られる LOXⅡを可溶化して変性条件下で精製後、リフォールディングさせることを試みた。得られた組換え LOXⅡを用いて行ったミキシング結果およびグルテニン構造や製パン性への影響について報告する。

(1) K.SHIIBA *et. al*, 1991. Purification and characterization of lipoxygenase isozymes from wheat germ, Cereal Chem. 68(2):115-122
(2) K.SHIIBA *et. al,* 1993. Changes in solubility of wheat glutenin during fermentation. Food Science and Technology Research. 40(10):727-731

Lipoxygenase, glutenin, Baking quality

発表責任者：佐藤甫之（15rmb15@ms.dendai.ac.jp）

講演番号：3A06p12
講演日時：3 月 19 日 17:05～ A 校舎 06 会場

湯種生地の温度が澱粉及びタンパク質に与える影響
Effect of temperature on starch and protein in "yudane" dough
○杉山 貴洋[1]、松宮 健太郎[1]、吉田 匡[2]、松村 康生[1] ([1]京大院・農、[2](株)日清製粉グループ本社・基礎研究所)
○Takahiro Sugiyama[1], Kentaro Matsumiya[1], Masashi Yoshida[2], Yasuki Matsumura[1] ([1]Grad. Sch. of Agric.,Kyoto Univ., [2]Research Center for Basic Science, Nisshin Seifun Group Inc.)

【背景と目的】湯種法で作成されたパンは国内において広く流通している。湯種法は小麦粉に熱湯を加え、ミキシングした生地を一晩冷却した後に小麦粉と副材料を混合する製パン方法であり、その特徴はモチモチとした食感と独特な甘みをもつことである。湯種生地では小麦粉に熱湯を加えることで澱粉の糊化とタンパク質の変性が起こり、生地の冷却中にアミラーゼによる澱粉の分解が起こると考えられている。しかしながら、湯種生地の作成過程で、どの程度の生地温度の上昇が、澱粉やタンパク質にどのような影響を与えるのかを詳細に検討した例はない。本研究では湯種生地の温度を細かく設定し、その際に湯種生地に起こる変化を明らかにすることを目的とした。
【方法】小麦粉（タンパク質 12.2%, 灰分 0.41%）300 g に超純水 450 g を加え、業務用卓上ミキサー（レマコム製 RM-G10A, 158 rpm）で 3 分間混捏した。常温の水から沸騰水までを使用することにより、混捏後の生地温度が 26℃から 71℃になるサンプルを調製した。湯種生地中の澱粉の糊化状態と澱粉分解に関与する酵素の活性を調べるために DSC による吸熱量の測定と、生地抽出液中のβ―アミラーゼ活性の測定を行った。タンパク質の変性状態を調べるために酢酸抽出したタンパク質および SDS 抽出したタンパク質の定量、また FT-IR による二次構造解析を行った。さらに、湯種生地の構造を調べるために共焦点レーザー顕微鏡観察と動的粘弾性測定を行った。
【結果と考察】DSC 測定の結果から、湯種生地混捏後の温度が 49℃以上（70℃の湯を加水）になると、未糊化澱粉の量が大幅に減少することが明らかになった。β-アミラーゼについては、混捏後の生地温度が 57℃より高いサンプルでは、生地抽出液中に活性画分が抽出されにくくなる傾向が認められた。タンパク質の変性状態を解析した結果から、生地温度の上昇によりタンパク質は徐々に変性を起こし、混捏後の生地温度 71℃のサンプルでは明瞭にタンパク質が変性していることが示された。共焦点レーザー顕微鏡観察により、生地温度の上昇による澱粉の糊化が観察されるとともに、タンパク質ネットワークが疎になっている様子が観察され、タンパク質の変性の進行が示唆された。動的粘弾性測定の結果から、混捏後の生地温度の上昇に伴い湯種生地の弾性率が上昇することが示された。

wheat flour dough, starch, gluten

講演番号：3A06p13
講演日時：3 月 19 日 17:20～ A 校舎 06 会場

# ナットウ等各種粘性食材を用いたグルテンフリーパンの製造研究

# Development of gluten-free bread with various viscosity ingredients such as Natto

○田原 彩[1]、竹内 美貴[2]、中村 智英子[2]、瀬口 正晴[3] ([1]大阪成蹊短大、[2]神戸女子短大、[3]神戸女子大学家政)
○Aya TABARA[1], Miki TAKEUCHI[2], Chieko NAKAMURA[2], Masaharu SEGUCHI[3] ([1]Osaka Seikei College, [2]Kobe Women's Junior College, [3]Kobe Women's Univ.)

【目的】これまで山芋（自然薯、大和芋、長芋、山の芋)、バナナ、がごめ昆布等、特有の粘りを示す多種類の食材を用いてグルテンフリーパンの製造を行い、自然薯[1)]および過熟バナナ[2)]で小麦粉パン同様の製パン性の得られることを確認した。これらの研究より、十分な膨らみのあるグルテンフリーパンを得るためには、自然薯、過熟バナナ等のような粘りが必要であることがわかった。本研究ではこれまで用いたことのない粘性食材（納豆、オクラ、ナメコ、モズクなど）を利用し、如何なる粘性食材でも良好な製パン性を得ることができるのか、納豆を中心にそれぞれの製パン製造の可能性について検討を進めた。
【方法】各種粘性食材には市販の納豆、オクラ、ナメコ、モズクを用いた。納豆は水を加えて撹拌し粘りを出した後、遠心分離で豆と粘性物質に分け粘性物質のみ凍結乾燥後、粉砕したものを粘性物質粉とした。製パン試験は、粘性物質粉 1g、小麦デンプン 30g、砂糖 8.86g、生イースト 10g、水 15.0mL を混合しパン生地を調製し、40℃の恒温槽で 20 分間発酵を行い、210℃のオーブン中で 10 分間ベーキングを行った。次に粘性物質粉をオートクレーブ処理した後、凍結乾燥し、製パン試験を行った。さらに粘性物質粉を水に懸濁した後、透析により内液と外液に分離し、それぞれ得られたサンプルを用いて製パン試験を行った。透析内液（高分子量区分）はペーパークロマトグラフィーによる粘性成分の同定を行った。また、納豆以外の粘性食材（オクラ、ナメコ、モズク）については、水洗、凍結乾燥後、粉砕し、それぞれ製パン試験を行った。
【結果】納豆の場合、粘性物質粉 1g、加水量は 15.0mL の条件で製パン試験を行うと、高い製パン性が得られたが、粘性物質をオートクレーブ処理すると製パン性は著しく低下した。また粘性物質を透析したところ、透析外液（低分子量区分）ではパンは膨化しなかったが、透析内液（高分子量区分）を加えると良好な製パン性の得られることを確認した。さらに、高分子量区分をペーパークロマトグラフィーで同定したところ、グルタミン酸ポリペプチドとフラクタンの混合物の存在することが推察された。したがって、納豆の場合は高分子量区分に含まれる粘性成分が製パン性に関与していることが推察された。また、オクラ、ナメコ、モズクについても、各乾燥粉末量と加水量を変化させ粘度を調製することで、良好な製パン性の得られることがわかった。

1) M. Seguchi et al. Food Sci. Technol. Res., 18(4), 543-548 (2012)
2) M. Seguchi et al. Food Sci. Technol. Res., 20(3), 613-619 (2014)

gluten-free bread, viscosity ingredients, Natto-bread

発表責任者：田原彩（tabara@osaka-seikei.ac.jp）

講演番号：3A06p14
講演日時：3 月 19 日 17:35～ A 校舎 06 会場

Alkaline Type and Egg Albumin Affecting on the Qualities of Gluten Free Alkaline Noodles
○Suparut SUTHEEVES, Piyachat CHAI-UEA, Doungjai THIRATHUMTHAVORN (Silpakorn Univ.)

Alkaline noodle were prepared from wheat flour, water, alkaline reagents or a combination of alkaline reagents (primarily sodium and potassium carbonates known as kansui) and sodium chloride.
Types of alkaline reagents have affected to the properties of cooked wheat noodles. In addition, the incorporation of egg albumin protein could be improved cooking properties and texture in wheat noodles. However, the traditional noodle prepared with wheat flour, cannot be consumed by the entire population, because some individuals are intolerant to gluten present in this flour. One way to solve a problem this is by using rice flour instead of wheat flour in noodles. The objective of this study was to investigate alkaline types (sodium carbonate and sodium carbonate mixed with potassium carbonate in ratios of 9:1( and the addition of egg albumin on cooking property and texture characteristic of alkaline rice noodles. The results showed that hardness, springiness, gumminess and chewiness were not significantly affected by those treatments. The gluten-free noodles containing sodium carbonate had lower adhesiveness, cooking time and cooking yield compared to the samples produced with mixture of sodium and potassium carbonate. The addition of egg albumin decreased cohesiveness, resilience and cooking loss of gluten-free noodles. In conclusion, alkaline type and egg albumin had an effect on the qualities of gluten-free rice noodle.
**Keywords:** Gluten-free, rice noodle, alkaline reagents, egg albumin, texture, cooking quality

**Reference**

Khouryieh, H., Herald, T. and Aramouni, F. 2006. Quality and Sensory Properties of Fresh Egg
Noodles Formulated with Either Total or Partial Replacement of Egg Substitutes. Journal of Food Science. 71)6(: S433–S437.
Marti, A., Barbiroli, A., Marengo, M., Fongaro, L., Iametti, S. and Pagani, M.A. 2014. Structuring and texturing gluten-free pasta: egg albumen or whey proteins?. European Food Research and Technology. 238: 217–224.
Widjaya, C. 2010. The Impact of Ingredient Formulation and Processing Parameters on Colour and Texture of Instant Noodles. Doctor's Thesis, Science, Engineering and Technology Portfolio, RMIT University.

rice noodle, egg albumin, alkaline reagents

発表責任者：Doungjai Thirathumthavorn（thdoungjai@yahoo.com）

講演番号：3A06p15
講演日時：3 月 19 日 17:50～ A 校舎 06 会場

# The Effect of Hydrocolloids on Characteristics of Gluten-free Yeast Doughnut

○Chanikorn KONGPANICHTRAKUL, Prasong SIRIWONGWILAICHAT (Silpakorn Univ.)

Gluten is an allergen found in wheat flour. People having a celiac disease are lack of protein digestion capability. Many fried foods are either bread or made from dough containing wheat flour. Alternative materials are consequently necessary for wheat substitution but changes in physical and sensory properties could be anticipated. Therefore, the objective of this study was to develop the quality of gluten-free doughnut by adding hydrocolloids including carboxy methyl cellulose (CMC), hydroxypropyl methyl cellulose (HPMC), xanthan gum, citri-fi, wellence gluten-free and walocel at 1 g/ 100 g flour. The control doughnut made from wheat flour with xanthan gum concentration of 1g/ 100g flour and the gluten-free doughnuts made from jasmine rice flour, buckwheat flour and corn flour at ratio of 50:30:20 respectively with hydrocolloids addition. The doughnut samples before and after frying were subsequently evaluated for %mass change, %volume change, %density changes, moisture content, color and texture. According to the study, it was found that the gluten-free doughnut with xanthan gum (28.90%) had higher moisture content than control wheat doughnut (26.72%). The gluten-free doughnut with HPMC addition had the most similar %volume change and %density change to the control wheat doughnut. Although gluten-free doughnut had significantly poorer texture than control wheat doughnut, xanthan gum and HPMC improved quality of gluten-free doughnut with similar physical properties to the control sample.

gluten-free doughnut, buckwheat flour, jasmine rice flour

発表責任者：KONGPANICHTRAKUL Chanikorn（Pook_11193@hotmail.com）

講演番号：3A06p16
講演日時：3 月 19 日 18:05～ A 校舎 06 会場

冷凍ピザの抗酸化活性を高める加熱方法の研究
New Heating Method for Increasing the Antioxidant Capacity of Frozen Pizza
○CHEUNG Lennie、冨田 晴雄、竹森 利和（大阪ガス株式会社）
○Lennie CHEUNG, Haruo TOMITA, Toshikazu TAKEMORI (Osaka Gas Co., Ltd.)

**目的**　**おいしく健康性の高い食品が望まれる。しかし健康性を重視すると、おいしさが低下し、販売が伸びなかった例は少なくない。**本研究の目的は、市販の冷凍ピザを題材にし、同じ食材を用いて、**おいしさを維持または向上させながら、健康性（抗酸化活性）を高める加熱法を考案することである。**

**方法**　健康性・おいしさを加熱で増加した野菜とクラストを冷凍ピザ用材料として使った場合、ピザの健康性・おいしさも増加すると仮説を立てた。従来の冷凍ピザ加工手法と比べ、本手法は二つの特徴がある：（１）野菜トッピングは冷凍前にスチームによるブランチングする代わりに、炒めによるブランチングを行い（２）クラストの上面を褐変させるため従来より高温短時間で焼く。本手法による冷凍ピザ製造法は以下の通り。

玉ねぎ、ピーマン（野菜）とピザクラストは、健康性（DPPH 抗酸化活性（DPPH-RSA）とトータルポリフェノール量(TPC)）を最も高める加熱法を調べるため、加熱時間と健康性の関係を評価した。野菜は 250 度に設定したホットプレートで 4 種類の加熱時間で焼成した。ピザクラストは市販品を用い、3 種類の加熱温度×時間で焼成した。調理中のピザクラストの中心温度および庫内温度は熱電対で測定した。これらの結果に基づき最適加熱条件を定め、最適なプレヒートを行った野菜・クラストをピザにして冷凍した。

本手法と従来手法（3 分間スチームした後に冷凍した野菜を市販のピザクラストに載せ冷凍）で作った２つのピザに、プレヒートを行っていないチーズ、トマトソース、サラミを載せて冷凍し、電子レンジで再加熱した。再加熱した野菜・クラストの健康性を化学分析した。

**結果**　本手法によるピザ全体の DPPH-RSA および TPC は、それぞれ、従来方法の 1.5 倍、1.1 倍になった。その原因は、前者はメイラード反応による抗酸化物質の生成（ピザクラスト、玉ねぎ）、後者は野菜の細胞崩壊によるポリフェノール抽出量増加（玉ねぎ）と思われる。ピーマンでは、新手法のほうが従来手法よりも DPPH-RSA が高かった。新手法は生と同等であったが、従来手法は生よりも減少したためである。官能検査では、両手法による野菜のおいしさ（味覚、食感、香り等）は異るにも関わらず、チーズやトマトソースの影響が強かったため、両手法による差は生じなかった。再加熱したクラストは固くなりやすいなので、DPPH-RSA を最適化しながら水分損失を最小化する焼成方法が必要であることがわかった。

**結論**　本手法（全体ピザ用食材を冷凍前にそれぞれプレヒート）を用いて、健康ピザができた。

Antioxidant Capacity, Heat Processing, Frozen Food

発表責任者：チャンレニー（l-cheung@osakagas.co.jp）

講演番号：3A07a01
講演日時：3 月 19 日 09:20～ A 校舎 07 会場

*Lactobacillus casei* subsp. *casei* 327 摂取が健常女性の肌状態に与える影響
Effect of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 327 intake on skin condition in healthy women

○齊藤 雄飛[1]、丸山 健太郎[1]、池田 麻純[2]、朝長 昭仁[3]、熊谷 武久[1] ([1]亀田製菓(株)、[2](医)快晴会 しらゆり皮フ科・整形外科、[3](医)快晴会 田奈整形外科・外科)
○Yuhi SAITO[1], Kentaro MARUYAMA[1], Massumi IKEDA[2], Akihito TOMONAGA[3], Takehisa KUMAGAI[1] ([1]KAMEDA SEIKA CO., LTD., [2]Shirayuri Clinic, [3]Tana Orthopaedic Surgery)

【目的】演者らはこれまでに、玄米から分離した乳酸菌 *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 327（327 株）が、ヒトの便通改善効果を有することを報告した[1)]。また女子大生を対象としたパイロット試験を行い、327 株摂取による冬期の肌状態の悪化が抑制されることを確認した。本研究では、327 株摂取による健常女性の肌状態への影響を検証することを目的とした。
【方法】事前検査および摂取前検査を行い、212 名から経表皮水分蒸散量が高めの女性 64 名を選抜し、10 月から 12 月にかけて摂取試験を行った。試験デザインは、ランダム化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験とした。乳酸菌含有錠（327 株殺菌体 50mg 含有、生菌換算で $1\times10^{11}$ CFU 相当/ 日）もしくはプラセボ錠を 8 週間継続摂取させた。経表皮水分蒸散量および角層水分量を主要評価項目とした。測定部位は右頬および左上腕とし、可能な限り同じ部位を測定した。
【結果】全被験者 64 名のうち 1 名が自己都合により試験を辞退し、脱落となった。また解析対象除外基準への抵触等により 5 名を解析から除外し、58 名を対象として有効性評価を行った。327 株摂取群では、左上腕の経表皮水分蒸散量の変化量がプラセボ摂取群と比較し、4 週目で有意に低く、8 週目で低下傾向が見られた。右頬では有意差はないが、値の低下が見られた。角層水分量の変化量の群間比較では、4、8 週目いずれにおいても有意差は見られなかった。なお、副作用および試験食摂取に関連する有害事象は見られなかった。以上の結果から、327 株の継続摂取により、肌が乾燥しやすい女性の肌の乾燥を緩和することが示唆された。

[1)] 熊谷ら：食品工業、52 (6)、26 (2009)

*Lactobacillus casei* 327, skin condition, intake

講演番号：3A07a02
講演日時：3 月 19 日 09:35～ A 校舎 07 会場

漬物由来乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* TK61406 の摂取が腸内環境, 肌状態および集中力に及ぼす影響

Effects of consuming *Lactobacillus plantarum* strain TK61406 isolated from pickles on the intestinal environment, skin condition, and concentration

○森下 美香、西尾 翔子、伊與田 哲也、小室 あゆ美、河本 哲宏（東海漬物）
○MIKA MORISHITA, SHOKO NISHIO, TETSUYA IYODA, AYUMI KOMURO, TETSUHIRO KAWAMOTO (Tokai Pickling Co.,Ltd.)

【目的】
漬物由来乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* TK61406（TK61406）の連続摂取における腸内環境，肌状態および集中力への影響を検討するため，便秘傾向の成人男女 30 名を対象に，TK61406 を 25 億 cfu 含む発酵液 2.5 mL を 1 日 1 回，12 週間連続摂取した際の，プラセボを対照とした二重盲検ランダム化並行群間比較試験を行った。
【方法】
試験食は，乳酸菌 TK61406（生菌）$1\times10^9$ cfu/mL を含む発酵液 2.5 mL を用いた。プラセボ食は，試験食と区別のつかないように作成した，乳酸菌を含まない溶液 2.5 mL を用いた。試験食またはプラセボ食 2.5 mL を飲用水（0－40°C）40 mL で希釈し（合計 42.5 mL），1 日 1 回，食事後摂取させた。摂取前，摂取期および摂取終了後の後観察期において，被験者日誌による排便状況の確認，糞便検査，顔肌状態の検査，連続計算負荷試験および唾液アミラーゼ酵素反応検査を実施した。排便状況は，被験者日誌を用い，毎日の食事状況，排便回数，排便量スコア，便性状スコアを記録してもらった。糞便検査は，TK61406 数，*Lactobacillus* 数，*Bifidobacterium* 数，総嫌気性細菌数，pH およびアンモニア濃度を測定した。顔肌状態検査は，Robo Skin Analyzer R SA50 および Clinical Suite 2.1（インフォワード）を使用し，水分，油分，きめ，色合い，鮮やかさ，明るさ，色素沈着，毛穴，赤味，眼下のしわおよび目尻のしわを測定した。連続計算には iPad mini 2 の連続計算用ソフト「脳トレーニング 暗算ドリル」を用い，2 桁の足し算を 30 問実施した際の正解数および計算時間を記録した。唾液アミラーゼ酵素反応検査は，唾液アミラーゼモニター（ニプロ）を用い，計算前と計算後の 2 回，唾液中のアミラーゼを測定した。
【結果・考察】
プラセボ食群と比べ，試験食群の糞便内ビフィズス菌および乳酸菌数が有意に増え，アンモニア濃度が有意に減ったことから，TK61406 の腸内環境改善作用が確認された（$P$ <0.05）。しかし、排便状況については改善作用が見られなかった。また，摂取 8 週後および 12 週後において，プラセボ食群と比べ，試験食群の顔肌の目立つ毛穴数が有意に減ったことから，TK61406 には肌の調子を整える作用があると考えられた。さらに，摂取 4 週後において，プラセボ食群と比べ，試験食群の連続計算負荷試験時の計算時間が有意に速くなった。

*Lactobacillus plantarum*, Probiotics, Intestinal environment

発表責任者：森下美香（morishita-mika@kyuchan.co.jp）

講演番号：3A07a03
講演日時：3 月 19 日 09:50～ A 校舎 07 会場

抗ピロリ菌鶏卵抗体配合ヨーグルトのヒトボランティア試験による有効性の検証
Validation of effectiveness by human volunteer test of yogurt containing anti-H. pylori hen egg antibody
○堀江 健二、坂下 真耶、山下 裕輔、金 武祚（（株）ファーマフーズ)
○ Kenji HORIE, Maya SAKASHITA, Yusuke YAMASHITA, Mujo KIM (Pharma Foods International Co., LTD.)

【目的】我が国における*Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ ｐｙｌｏｒｉ*（ピロリ菌）の感染率は総人口の約４０％と推定され、感染者は胃潰瘍、十二指腸潰瘍ならびに胃癌などの発症リスクが高いと報告されている。現在ピロリ菌の除菌療法にはプロトンポンプ阻害剤にクラリスロマイシンなどの抗生物質を混ぜた３剤もしくは４剤併用療法が用いられている。一方、抗生物質耐性型のピロリ菌が増えてきており、その為徐々に除菌率が低下している事が近年問題視されている。この様な背景のもと、胃内のピロリ菌を抑制するプロバイオティクス食品の活用が注目を集めている。我々は短時間でピロリ菌の活動を抑制する効果がある抗ピロリ菌鶏卵抗体含有食品素材（以下、抗ピロリ菌ＩｇＹ）（商品名：オボプロン - ＨＰ）の開発に成功した。本研究では抗ピロリ菌ＩｇＹを配合したヨーグルトを作製し、大規模なヒト臨床試験により効果を検証したので報告する。

【方法】ピロリ菌を培養後、このものを抗原とし産卵鶏に免疫を行った。卵黄中の抗ピロリ菌抗体価が上昇した４週目以降の卵を採取し、均質な卵黄液を調製した（抗ピロリ菌ＩｇＹ）。
被験食品群として抗ピロリ菌ＩｇＹ配合ヨーグルト（抗ピロリ菌ＩｇＹ　２ｇ／１１０ｇヨーグルト）を、プラセボ群として抗ピロリ菌ＩｇＹ無配合ヨーグルトを用いた。ボランティアの選抜は、胃の不快感のある４０～７９歳までの男女９００名を対象に、尿素呼気試験（Ｕｒｅａ Ｂｒｅａｔｈ Ｔｅｓｔ：ＵＢＴ）、便中ピロリ菌抗原測定法（*H. ｐｙｌｏｒｉ* ｓｔｏｏｌ ａｎｔｉｇｅｎ ｔｅｓｔ：ＨｐＳＡ）ならびに胃の不快感に関するアンケートを実施した。選択者の中から、ピロリ菌陽性者でＵＢＴ３０‰以上ならびに胃の不快感を伴う４０名（男性１６人、女性２４人）を対象者とし、このものを２群（プラセボ群：２０名、抗ピロリ菌ＩｇＹ群：２０名）に分け、１日１個、試験対象食品の摂取を行った。摂取後、４、８、１２週で所定の検査を実施した。本試験では、二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験を実施した。

【結果】抗ピロリ菌ＩｇＹ配合ヨーグルトを摂取する事で、ＵＢＴの値が摂取１２週目で約４０％程度の低下が認められ、プラセボヨーグルトと比較し有意な減少を確認する事ができた。このことから胃内のピロリ菌数の減少が示唆され、抗ピロリ菌ＩｇＹ配合ヨーグルト有用性が確認された。
『本事業は、中小企業Ｒ＆Ｄ支援事業（京都府・京都産業２１）の補助事業により実施した』

H.pylori, IgY, yogurt

発表責任者：堀江　健二（khorie@pharmafoods.co.jp）

講演番号：3A07a04
講演日時：3 月 19 日 10:05～ A 校舎 07 会場

ビフィズス菌の摂取が幼児の下痢や感冒様症状の発症に与える影響の検討
Study on oral administration of bifidobacteria on incidence of acute diarrhea and/or respiratory-related illnesses of kindergarten children
○柳澤 尚武[1]、LAU Amy Sie-Yik[2]、小林 洋大[1]、清水（肖） 金忠[1]、LIONG Min-Tze[2] ([1]森永乳業株式会社、[2]マレーシアサインズ大学)
○Naotake YANAGISAWA[1], Amy Sie-Yik LAU[2], Yodai KOBAYASHI[1], Jin-Zhong XIAO[1], Min-Tze LIONG[2] ([1]Morinaga Milk Industry Co., Ltd., [2]School of Industrial Technology, University of Science Malaysia)

【目的】プロバイオティクスには抗アレルギー作用や免疫賦活作用など様々な機能が知られており、健康増進や生活習慣病の予防などに役に立つと考えられている。そこで我々は、マレーシアの健康な幼児を対象として、ビフィズス菌の摂取が、下痢や感冒様症状などの発症に及ぼす影響を検討した。

【方法】本臨床試験は、2015 年 4 月から 2016 年 6 月にかけて、マレーシアのペナン州およびクランタン州を中心とした託児所または幼稚園に通う、2 歳から 6 歳までの健康な幼児 520 例（男児：268 例（51.5%）；平均年齢：4.1±1.3 歳）を対象として行われた。試験デザインはランダム化プラセボ対照二重盲検並行群間比較試験（摂取群：259 例；プラセボ群：261 例）とし、被験者に週 5 日毎日、10 ヵ月間、ビフィズス菌 1g/包（$5\times10^9$ CFU/day）か、デキストリンからなるプラセボ 1g/包を摂取させた。調査項目は、被験者背景（年齢、性別、BMI や健康状態など）および下痢の症状や感冒様症状（発熱、のど痛み、咳、鼻水など）の罹患回数や罹患日数などで、試験期間中 1 ヵ月毎に収集した。

【結果】本試験では被験者を 10 ヵ月間追跡したが、各測定項目において約 20%の欠測値を含むため、今回の解析では、すべての測定項目で調査を完遂した被験者（被験者数：219 例；摂取群：109 例；プラセボ群：110 例）を抽出して解析を行った。被験者背景について、年齢、性別および BMI は、群間で差はなかった。全試験期間中における、被験者毎、症状毎の罹患回数または罹患日数の合計値を算出し群間比較したところ、下痢の罹患回数（摂取群：51 回；プラセボ群：42 回；p=0.996）および罹患日数（摂取群：57 日；プラセボ群：45 日；p=0.996）には有意な群間差はなかったが、感冒様症状の罹患日数において、のどの痛み（摂取群：293 日；プラセボ群：549 日；p=0.018）では摂取群で有意に低くなっており、発熱（摂取群：147 日；プラセボ群：206 日；p=0.084）や咳（摂取群：690 日；プラセボ群：832 日；p=0.087)、鼻水（摂取群：622 日；プラセボ群：724 日；p=0.087）では、摂取群で低い傾向にあった。以上より、ビフィズス菌の長期摂取は、感冒様症状を改善する可能性があることが示された。

bifidobacteria, children, respiratory-related illnesses

講演番号：3A07a05
講演日時：3 月 19 日 10:20～ A 校舎 07 会場

# 洪水災害後の衛生環境悪化に起因する腹部症状と腸内細菌叢の関係およびビフィズス菌 M-63 摂取による精神状態の改善効果

# Relationship between gut microbiota and abdominal symptoms attributed to poor water, sanitation and hygiene practice after flood disaster, and improvement of mentation on victims by oral intake of Bifidobacterium longum subsp. infantis M-63

○菅原 宏祐[1]、小田巻 俊孝[1]、Yaacob Nurhazwany[2]、Liong Min Tze[3]、清水(肖) 金忠[1]、Lee Yeong Yeh[2] ([1]森永乳業基礎研、[2]マレーシアサインズ大学医学研究科、[3]マレーシアサインズ大学産業技術研究科)

○ Hirosuke SUGAHARA[1], Toshitaka ODAMAKI[1], Nurhazwany Yaacob[2], Min Tze Liong[3], Jinzhong Xiao[1], Yeong Yeh Lee[2] ([1]Morinaga Milk Industry Co., Ltd., [2]School of Medical Sciences, Universiti Sains Malaysia, [3]School of Industrial Technology, Universiti Sains Malaysia)

＜目的＞予期せぬ自然災害は衛生環境の悪化を引き起こし、被災者における腹部症状の発症や精神状態に多大な影響を与える。本研究では、洪水被災者の腹部各症状と腸内細菌叢構成の関係、さらに有症者に対してプロバイオティクス投与による健康状態への影響について調査した。

＜方法＞

試験Ⅰ:2014 年 12 月マレーシア Kelantan 地区で発生した洪水の被災者 73 人に対して災害 6 か月後の腹部症状に関する診断を行い、全員から提出頂いた便サンプルを用いて Miseq による 16S メタゲノム解析を行った。

試験Ⅱ:腹部症状を有する被験者 11 名はビフィズス菌 M-63 菌末(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*、10 億 cfu/日)を 3 ヶ月間摂取し(摂取群)、非摂取 20 名を対照群としたオープン試験を実施した。摂取前後の臨床症状の評価とともに、SF-36 を用いて精神関連 QOL を評価した。また、試験食品摂取前後のタイミングで被験者から得た糞便を用いて試験Ⅰ同様に腸内細菌を解析、臨床症状との関連を評価した。

＜結果＞

試験Ⅰ:9 名が小腸細菌異常増殖(SIBO)有症者であると診断され、腸内細菌叢を無症者 64 名と比較したところ、Proteobacteria の占有率が有意に高く、腸内細菌の多様性が有意に低い値を示した。腹痛の有症者(16 名)は無症者(57 名)と比較して Fusobacteria の占有率が有意に高かった。

試験Ⅱ:SF-36 による心の健康および精神的健康度のスコアは試験期間中の変動値および摂取後の値ともに非摂取群と比較して摂取群で有意な改善が認められた。また、摂取前には両群で有意差の認められなかった Firmicutes および Bacteroidetes の占有率が摂取後には群間有意差を示した。さらに、摂取後における Firmicutes/Bacteroidetes 比は、非摂取群と比較して摂取群で有意に低い値を示し、精神的健康度のスコアと有意な負の相関を示した。

以上の結果から、洪水発生後に発症した腹部症状の異常には腸内細菌叢の関与が示唆され、その腹部症状に影響される精神状態の改善にプロバイオティクスの摂取が有用である可能性が示された。

Bifidobacterium, Mentation, Microbiota

講演番号：3A07a06
講演日時：3 月 19 日 10:45～ A 校舎 07 会場

# Piceatannol の破骨細胞に及ぼす影響

Effect of piceatannol on osteoclasts

○藤原 葉子[1,2]、高 優子[1]、田邉 采佳[1]、川和 理恵[1]、石川 朋子[2]、市 育代[1,2]、内田 裕子[3]、齋 政彦[3] ([1]お茶大食物、[2]お茶大 HLI 研、[3]森永製菓（株））

○Yoko Fujiwara[1,2], Yuko Ko[1], Saika Tanabe[1], Rie Kawawa[1], Tomoko Ishikawa[2], Ikuyo Ichi[1,2], Hiroko Uchida[3], Masahiko Sai[3] ([1]Ochanomizu Univ., [2]Ochanomizu Univ. IHLI, [3]Morinaga & Co., Ltd.)

【目的】Piceatannol はパッションフルーツの種子に多く含まれる Resveratrol 類縁のポリフェノールで、Resveratrol と同様な生理作用を持つことが知られている。抗酸化活性や eNOS の活性化については Resveratrol より強いという報告もあるが、Piceatannol の生理機能に関する知見は未だ少ない。そこで本実験では、Piceatannol が破骨細胞に与える影響を調べることを目的とした。

【方法】8 週齢の ddY 雄性マウスの脛骨および大腿骨から骨髄細胞を初代培養し、破骨細胞増殖因子である M-CSF および破骨細胞分化因子である Receptor activator of nuclear factor-κB ligand (RANKL) 存在下で破骨細胞に分化させた。Piceatannol の細胞毒性は MTT アッセイで評価した。Piceatannol を終濃度 1, 5, 10 μM になるように播種後と 3 日目の培地交換の際に添加し、以下の実験に用いた。破骨細胞の分化および成熟は、破骨細胞特異的に発現する酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ(TRAP)を染色し、多核化した細胞の数とその核の数を数えることで評価した。また、培養後細胞から mRNA を抽出し、カテプシン K や MMP-9 などの破骨細胞のマーカーの発現量を定量 RT-PCR 法にて測定した。

【結果】1～10μM の Piceatannol を添加した細胞の MTT アッセイの結果、細胞生存率にほとんど影響は認められなかった。播種後 4 日目に TRAP 染色を行ったところ、Piceatannol は 5μM から顕著な破骨細胞形成・成熟の抑制が認められ、その効果は Resveratrol や Piceatannol の代謝物である Isorhapontigenin よりも強かった。また、培養初期播種後 3 日目の培地交換から経時的(0, 2, 6, 24 時間後)に mRNA 発現量を調べたところ、破骨化に最も影響を与える分化の初期段階において、Piceatannol は強く抑制していることがわかった。3 日目の培地交換 6 時間後に回収した細胞から mRNA を抽出し、定量 RT-PCR を行ったところ、Piceatannol 5μM を添加することで、破骨細胞関連マーカーであるカテプシン K、MMP-9、破骨細胞の多核化に必須である DC-STAMP などの破骨細胞マーカーが有意に減少していた。また Resveratrol は NF-κB 経路を下方制御することで破骨細胞形成・成熟を抑制するという報告があることから、本実験においても Piceatannol の破骨細胞形成・成熟の抑制と NF-κB 経路との関係を、ウエスタンブロット法により検討中である。

piceatannol, osteoclast, polyphenol

発表責任者：藤原葉子（fujiwara.yoko@ocha.ac.jp）

講演番号：3A07a07
講演日時：3 月 19 日 11:00～ A 校舎 07 会場

キノコに含まれるシリンガ酸はエストロゲンレセプター非依存的に骨粗鬆症モデルマウスの骨密度減少を抑制する
Syringic acid contained in fungi suppresses ovariectomy-induced bone loss independent of estrogen receptor-mediated pathway

○田中 照佳[1]、川口 信久[2]、財満 信宏[1]、森山 達哉[1]、福田 泰久[1]、白坂 憲章[1] ([1]近畿大農、[2]一正蒲鉾)
○Teruyoshi TANAKA[1], Nobuhisa KAWAGUCHI[2], Nobuhiro ZAIMA[1], Tatsuya MORIYAMA[1], Yasuhisa FUKUTA[1], Norifumi SHIRASAKA[1] ([1]Kindai Univ, [2]Ichimasa Kamaboko)

【目的】骨粗鬆症は、骨量の減少と骨内部の構造変化という生理現象が過度に進行した疾患である。通常、骨量は骨形成と骨吸収のバランスが保たれて一定に維持されているが、加齢や閉経により、このバランスが崩れ、骨吸収量過多により骨粗鬆症が生じる。骨粗鬆症予防のために、様々な食品素材や食品成分の効果が検討されているが、決定的なものは見出されていない。現在、主に推進されている食品素材は豆イソフラボンである。しかし、大豆イソフラボンは女性ホルモンであるエストロゲンと類似した構造を有すため、過剰摂取による副作用として乳ガンや子宮ガンの発症リスクを高める危険性がある。骨粗鬆症の発症の予防に有効であり、かつ安全性の高い食品成分の探索が嘱望されている。シリンガ酸はキノコ等に含有する植物の二次代謝産物である。シリンガ酸はエストロゲンレセプターに対する結合活性が全くなく、過剰摂取による乳ガンや子宮ガンに対する発症リスクは非常に弱いと考えられる。シリンガ酸は「ラジカル消去活性」や「抗酸化活性」を持つことから、これらの作用により「破骨細胞」の分化抑制作用を持つことを推定し、骨粗鬆症モデルマウスである卵巣摘出（OVX）マウスに対するシリンガ酸の影響を検討した。
【方法】10 週齢の OVX マウスにシリンガ酸を 100 mg/kg body weight の用量で 10 週間摂取させた。骨吸収マーカーとして血清 TRAP 活性と尿中 DPD レベルを、骨形成マーカーとして血中 BAP 活性を測定し、摘出大腿骨遠位部における TRAP 陽性破骨細胞および ALP 陽性骨芽細胞の観察を行った。骨密度の測定は、X 線 CT により解析した。また、大腿骨研磨標本を作製し、骨微細構造を観察した。シリンガ酸の in vivo におけるエストロゲン様活性は子宮重量の測定によって行った。
【結果および考察】キノコ等に含まれるシリンガ酸を経口摂取した OVX マウスの血清 TRAP 活性および尿中 DPD レベルは非摂取群と比較し有意に減少し、血中 BAP 活性は有意に増加した。これらと相関して、大腿骨遠位部の TRAP 陽性破骨細胞は減少し、ALP 陽性骨芽細胞数は増加していた。また、シリンガ酸摂取 10 週間後の骨密度や大腿骨遠位部の研磨標本はシリンガ酸摂取群で改善効果が認められた。したがって、シリンガ酸の経口摂取は OVX マウスの破骨細胞を下方制御し、骨芽細胞を上方制御することで骨密度および骨微細構造が改善されることが示された。一方、シリンガ酸摂取群と非摂取群の子宮重量にほとんど差がなかったことから、シリンガ酸はエストロゲンレセプター非依存的に OVX マウスの骨代謝を改善することが示唆された。

syringic acid, ovariectomized mice, estrogen receptor

発表責任者：白坂憲章（sirasaka@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：3A07a08
講演日時：3 月 19 日 11:15～ A 校舎 07 会場

microRNA 発現を利用した骨芽細胞分化評価法の検討
Evaluation of osteoblast differentiation using microRNA expression
○伊藤 智広[1]、赤尾 幸博[2] ([1]三重大院　生資、[2]岐阜大院　連合創薬)
○Tomohiro ITOH[1], Yukihiro AKAO[2] ([1]Dept. Life Sci., Grad. Sch. Bioresources Mie Univ., [2]United Grad. Sch. Drug Discov.　Med. Info. Sci., Gifu Univ.)

【目的】MicroRNA(以下 miRNA)は 21-24 のヌクレオチドの機能性 RNA であり，標的となる mRNA の 3'非翻訳領域に対合することで mRNA からのタンパク質合成を阻害し，遺伝子発現を制御している。これまでに Bone morphogenetic protein-2（BMP-2）誘導による骨芽細胞分化に関わる miRNA とその標的遺伝子について研究したところ，分化刺激により顕著に発現変動する miRNA を確認した。本研究では，この分化刺激により発現変動した miRNAs が天然物に含まれる骨芽細胞分化促進作用を示す低分子化合物を探索するための新しいスクリーニングシステム構築に利用できないか検討した。
【方法】マウス頭蓋骨由来前駆骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞を BMP-2 により分化刺激を誘導した 24 時間後の細胞を回収し全 RNA を調製後，東レ 3 D-Gene miRNA Oligo chip によるアレイ解析に供し miRNA の発現プロフィール解析を行なった。その後，発現が顕著に発現変化した miRNA について標的となる分子を miRanda および TagetScan7.0 によるデータベース解析を行ない，標的分子を推定した。標的遺伝子の同定については，標的遺伝子の 3 '非翻訳領域に含まれる miRNA の結合サイトをクローニング後，センサーベクターを作製し，ルシフェラーゼレポータアッセイにより確認した。また，骨芽細胞分化関連 miRNA として確認した miRNA がスクリーニングマーカーとして機能するか確認するために，すでに骨芽細胞を分化する作用を示す小豆煮汁 40％エタノール抽出物（EtEx.40）により処理した細胞から全 RNA を調製し，Taqman 法による miRNA 発現定量解析を行なった。結果および考察】miRNA アレイ解析の結果，BMP-2 分化誘導刺激により発現が 2.5 倍以上変化した miRNA を 9 種類確認した。今回はこのうちの miRNA-141, -200a に着目し，標的分子の同定を行なった。その結果，miRNA-141 および-200a が骨形成分子の発現を制御する転写因子 distal-less homeobox 5（Dlx5）の翻訳を調節することで骨芽細胞の分化を制御していることが示された。また，EtEx.40 により処理した細胞における miRNA-141 および-200a の発現量を Taqman 法により定量したところ，未処理細胞の値と比較して 6 割ほど有意に低下した。以上の結果から，これら miRNA-141 および-200a が骨芽細胞分化誘導物質のスクリーニングマーカーとして機能することが推察された。今後は，これら miRNA のスクリーニングマーカーとしての機能する精度を高めるために，すでに骨芽細胞分化機能を示す他の天然物成分を用いて miRNA-141 および-200a の発現変化を検証するとともに，他に変動した骨芽細胞分化関連 miRNA のスクリーニングマーカーとしての検証を進めていきたい。

microRNA, osteoblast, differentiation

発表責任者：伊藤智広（titoh@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：3A07a09
講演日時：3 月 19 日 11:30～ A 校舎 07 会場

# グルコマンナンと難消化性オリゴ糖の摂取が高脂肪食摂取ラットの大腸 Alkaline phosphatase 活性と遺伝子発現に及ぼす影響

# Effects of dietary glucomannan and oligosaccharides on colonic alkaline phosphatase activity and the gene expression in rats fed a high-fat diet

○岡崎 由佳子、家入 千弓、前川 真理、杉本 佳奈（藤女子大・人間生活）
○Yukako OKAZAKI, Chiyumi IEIRI, Minori MAEKAWA, Kana SUGIMOTO (Fuji Women's Univ.)

【目的】我々は，食品素材であるユリネ摂取が，DSS 誘導性大腸炎を緩和することを明らかにした。この過程で，大腸の Alkaline phosphatase (ALP) 活性が上昇することを見出した。また，ユリネにグルコマンナンが多く含まれていることに着目し，グルコマンナンをはじめとする数種の水溶性食物繊維が大腸 ALP 活性を増加させることを明らかにした。さらに，大腸 ALP 活性は，腸管バリア機能の指標である Mucin や腸管免疫の指標である IgA と正の相関関係にあることを示した。本研究では，まずグルコマンナン摂取による大腸 ALP 遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。また，水溶性食物繊維と同様に，Mucin と IgA の増加作用が報告されている難消化性オリゴ糖も，大腸 ALP 活性と遺伝子発現に影響を与えるのかどうかについて検討を加えた。
【方法】実験動物として，4 週齢の SD 系雄ラットを用いた。高脂肪（30% Lard）の 5%セルロース食を基本食として，実験 1 では高粘度グルコマンナンと低粘度グルコマンナンを，実験 2 ではフルクトオリゴ糖とガラクトオリゴ糖をセルロースに置き換えて 4%添加した飼料を与えた。実験食は 14 日間自由摂取させた。飼育終了後，糞，大腸および小腸の ALP 活性を測定した。また，大腸 ALP 遺伝子（*IAP-I, Akp3, Alpl*）の発現解析（RT-PCR 法）を行った。さらに，糞中のムチン（蛍光光度法）と IgA（ELISA 法）を測定した。
【結果】実験 1 の結果より，糞と大腸組織の ALP 活性は，高粘度と低粘度グルコマンナンの摂取により有意に増加することが示された。大腸の ALP 遺伝子発現について検討したところ，小腸上部由来の *Akp3* および骨，肝臓，腎臓由来の *Alpl* の発現は，グルコマンナン摂取による影響を受けなかったが，小腸全域に局在する *IAP-I* の発現がグルコマンナン摂取により有意に増加することが認められた。実験 2 の結果より，糞中の ALP 活性は，フルクトオリゴ糖とガラクトオリゴ糖摂取により有意に増加した。大腸 ALP 活性も，フルクトオリゴ糖添加群により有意に増加し，ガラクトオリゴ糖添加群で同様の増加傾向が示された。また，大腸 *IAP-I* 発現は，フルクトオリゴ糖およびガラクトオリゴ糖添加食群において有意に増加することが明らかになった。糞中 IgA とムチン含量は，オリゴ糖添加食 2 群で有意に増加し，糞中 IgA およびムチン含量と大腸 ALP 活性の間には，有意な正の相関関係が認められた。以上の結果より，グルコマンナン摂取による大腸 ALP 活性の増加には，*IAP-I* 遺伝子発現の誘導が関与していると推定した。また，発酵性の難消化性オリゴ糖もグルコマンナン摂取と同様に，*IAP-I* 遺伝子発現の誘導を介して大腸 ALP 活性を増加させる可能性が示された。

Glucomannan, Oligosaccharides, Alkaline phosphatase

講演番号：3A07a10
講演日時：3 月 19 日 11:45～ A 校舎 07 会場

Agaro-oligosaccharide enhances tight junction of Caco-2 intestine epithelial cells

○Jun Bai[1], Nanami Ichikawa[2], Kouji Karasawa[3], Ikuya Shirai[3], Takehiko Sakai[3], Takakazu Mitani[4], Shigeru Katayama[2], Soichiro Nakamura[2] ([1]Dep. of Agric. of Grad. Sch. of Shinshu Univ., [2]Fac. of Agric. Shinshu Univ., [3]Ina Food Industry CO.,Ltd., [4]Shinshu Univ. ICCER)

【Purpose】 The human intestinal epithelium is formed by a single layer of epithelial cells that separates the intestinal lumen from the underlying lamina propria. Epithelial barrier properties are sealed by tight junction (TJ), which plays an important role in the regulation of the uptake of food and xenobiotic components. In East Asia, seaweed-derived agar is a major food ingredient. Agaro-oligosaccharides (AOS) is main component of polysaccharides in agar. Previous studies reported that AOS offers diverse health benefits such as anti-oxidative, anti-inflammatory and anti-bacterial effects. However, the effect of AOS on TJ of intestinal epithelial cells has not been studied. Thus, this study was conducted to investigate the effects of AOS on TJ of intestinal epithelium using Caco-2 cell monolayers.

【Method】 Caco-2, a human colonic epithelial cell line, was seeded in a Transwell and cultured for 21 days to differentiate into cell monolayers. After 21 days of differentiation, Caco-2 cells were incubated in the presence or absence of AOS for 2 hours. The TJ integrity was determined by measuring trans-epithelial electrical resistance (TEER) and lucifer yellow (LY) rejection assay. The gene expression levels of TJ-related proteins were analyzed by qPCR method. Moreover, the protein expression of Claudin-4 and -7 was determined by western blot. The localization of Claudin-4 and -7 was analyzed by immunofluorescence microscopy.

【Result】 At the end of 21 days differentiation, TEER value has reached to 800Ω・$cm^2$, which means a tight cell monolayers has been developed for small intestinal TJ model. TEER value was rapidly increased after the addition of AOS in Caco-2 cells monolayers and the permeability of LY was decreased by treatment of AOS. The gene expression of Claudin-4 and -7 and ZO-1 was upregulated by AOS. Moreover, the protein level of Claudin-4 and -7 was also increased by AOS. Result of immunofluorescence microscopy showed that Claudin-4 and -7 was interspersed in the cytoplasm in the absence of AOS, whereas Claudin-4 and -7 was localized in cytomembrane in the presence of AOS in Caco-2 cells. Our results indicated that AOS enhance tight junction of Caco-2 cell monolayers. Thus, AOS might be used as therapeutic agent for intestinal inflammation and diseases.

tight junction, agaro-oligosaccharide, Caco-2 cells

講演番号：3A07p01
講演日時：3 月 19 日 14:00～ A 校舎 07 会場

# 自然薯ムカゴ抽出物の生理的機能性について

# Physiological functionality of a Japanese yam propagule extract

○篠崎 文夏[1]、山下 治之[2]、亀井 飛鳥[1]、渡部 由貴[1]、安岡 顕人[1]、嶋田 耕育[1]、近藤 香[1]、近藤 隆[1]、荒井 綜一[1,3]、阿部 啓子[1,2] ([1]KAST、[2]東大農、[3]東農大)
○Fumika SHINOZAKI[1], Haruyuki YAMASHITA[2], Asuka KAMEI[1], Yuki WATANABE[1], Akihito YASUOKA[1], Kosuke SHIMADA[1], Kaori KONDO[1], Takashi KONDO[1], Soichi ARAI[1,3], Keiko ABE[1,2] ([1]KAST, [2]Univ. of Tokyo, [3]Tokyo Univ. Agri)

【目的】自然薯 *Dioscorea japonica* の根の部分には、滋養強壮、血糖降下作用や消化吸収促進作用などがあるとされるが、葉の根元にできる栄養繁殖器官であるムカゴについては機能性に関する知見はほぼない。我々はこれまでに自然薯ムカゴは比較的ポリフェノール含量および抗酸化能が高いことを見出し、自然薯ムカゴが生理的機能性を有すると推察した。また自然薯ムカゴ摂取が高脂肪負荷マウス肝臓において脂質代謝関連遺伝子を変動させることを報告した。本研究は自然薯ムカゴから、機能性に関与すると推察される抽出画分を作製し、その生理的機能性について検証することを目的として行った。
【方法】自然薯ムカゴの抽出物を 4 個に分画した。まずは有色画分について生理的機能性を検証した。マウスに通常脂肪食、エネルギー比 45%の高脂肪食およびムカゴ抽出物添加高脂肪食を与え 4 週間飼育後、血液および肝臓を採取した。肝臓から RNA を抽出し、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析を実施した。
【結果】飼育期間中の体重や摂取エネルギーにムカゴ抽出物の影響は認められなかった。血中のアスパラギン酸アミノ基転移酵素（AST）およびアラニンアミノ基転移酵（ALT）は高脂肪負荷によって通常食群より若干上昇するが正常範囲内変動であった。ムカゴ添加高脂肪食群は AST および ALT ともに高脂肪食群と同程度か高脂肪食群よりも通常脂肪食群に近い値を示した。肝臓の変動遺伝子から高脂肪食群で通常食群より上昇した遺伝子が、高脂肪食群とムカゴ抽出物添加高脂肪食群との比較ではムカゴ抽出物添加高脂肪食群の方が低下する遺伝子、つまりムカゴ抽出物によって高脂肪影響が軽減されると考えられる改善遺伝子は 179 個抽出された。また、逆の変動をする改善遺伝子は 90 個であった。これらの改善遺伝子について、GO Term 分類によってどのような機能を持つ遺伝子が変動しているかを調べた結果、多くが脂質代謝関連であった。さらに、パスウェイ解析の結果、コレステロール生合成および異化パスウェイの遺伝子が改善されることがわかった。以上の結果から、ムカゴ抽出物摂取群は高脂肪摂取によるコレステロール代謝異常を改善すると示唆された。また、これまでに報告したムカゴ粉での実験結果と類似点があることから、粉での結果の一部は本実験で使用した抽出物の影響である可能性が示された。

本研究の一部は、総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施されました。

propagules, DNA microarray, High-fat diet

講演番号：3A07p02
講演日時：3 月 19 日 14:15～ A 校舎 07 会場

セイヨウカノコソウが脂肪細胞分化と機能に与える影響
Effect of *Valeriana officinalis* on the differentiation and function of adipocytes
○原田 洸輔[1]、今村 ひよ子[1]、中村 夏芽[1]、仁科 淳良[2]、只石 幹[1]、清水 誠[1]、服部 一夫[1] ([1]東農大応生科、[2]日大理工)
○Kosuke HARADA[1], Hiyoko IMAMURA[1], Natsume NAKAMURA[1], Atsuyoshi NISHINA[2], Miki TADAISHI[1], Makoto SHIMIZU[1], Kazuo HATTORI[1] ([1]Tokyo University of Agriculture, [2]Nihon University)

【背景・目的】
現在の日本においてⅡ型糖尿病罹患者の増加が大きな問題となっている。Ⅱ型糖尿病の発症には脂肪細胞が深く関わっている。脂肪細胞機能には中性脂肪蓄積の他に生理活性物質の分泌がある。脂肪細胞が分泌するアディポネクチンはインスリン抵抗性を改善し、抗糖尿病作用を示すことが知られている。つまり、脂肪細胞機能の改善は糖尿病の改善につながると考えられる。本研究では、脂肪細胞に影響を及ぼす食品を探索するために、3T3-L1 前駆脂肪細胞を用いてスクリーニングを行った。その結果、オミナエシ科の植物であるセイヨウカノコソウ（*Valeriana officinalis*）を見出した。そこで本研究では、セイヨウカノコソウが脂肪細胞の分化や機能に与える影響について検討した。
【方法】
サンプルはセイヨウカノコソウの鱗茎のメタノール抽出物の乾燥物（Vale）を作成し、DMSO で終濃度が 1 μg/ml、10 μg/ml、100 μg/ml になるように調製した。ポジティブコントロールには rosiglitazone を用いた。3T3-L1 前駆脂肪細胞に分化誘導時から 8 日間添加し、Oil Red O 染色法を用い、脂肪細胞分化の評価を行った。Vale の細胞生存率に与える影響は MTT assay 法を用いて評価した。また、PPARγ及びアディポネクチンの mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR 法、培養上清中アディポネクチン量を ELISA 法を用いて測定した。さらに、Vale の作用と PPARγの関与を調べるために PPARγ特異的アンタゴニストである BADGE 存在下で脂肪細胞分化の評価を行った。
【結果・考察】
MTT assay 法により、Vale は細胞生存率に影響を及ぼさないことが示された。また、Oil Red O 染色法により、Vale 添加で小型脂肪滴が増加することが確認できた。さらに、Vale 添加により PPARγ及びアディポネクチン mRNA 発現量が有意に増加した。培養上清中のアディポネクチン量も Vale 添加により有意に増加した。このことから、Vale には脂肪細胞の分化を促進する作用ならびにアディポネクチン産生を誘導する作用が示された。次に、BADGE 存在下で Oil Red O 染色を行ったところ、小型脂肪滴の増加が阻害された。このことから、Vale は PPARγの活性化を介することで脂肪細胞分化を促進させ、アディポネクチン産生の誘導に関わっていることが示唆された。

*Valeriana officinalis*, adipocyte differentiation, adiponectin

講演番号：3A07p03
講演日時：3 月 19 日 14:30～ A 校舎 07 会場

# 米由来タンパク加水分解物のジペプチジルペプチダーゼ－4 阻害作用

# Inhibitory activity of rice-derived protein hydrolysate against dipeptidylpeptidase-4

○川上 賀代子[1]、守谷 智恵[1]、畑中 唯史[2]、坪井 誠二[1] ([1]就実大薬、[2]岡山生物研)
○Kayoko Kawakami[1], Chie Moritani[1], Tadashi Hatanaka[2], Seiji Tsuboi[1] ([1]Shujitsu Univ., [2]RIBS Okayama)

【目的】糖尿病は、血糖値を低下させるインスリンの量または作用不足により血糖値が上がる病態であり、その予防や改善には、インスリンの分泌を適切にコントロールすることが重要である。インスリン分泌にはインクレチンというホルモンが大きく寄与しており、このインクレチンは Dipeptidyl Peptidase-4（DPP-4）によって速やかに分解される。すなわち、DPP-4 を阻害することによりインスリンのコントロールが可能となるとなるため、DPP-4 阻害剤は新たな糖尿病治療薬として注目されている。本研究では、市販酵素を用いて米由来タンパク加水分解物を調製し、その DPP-4 活性阻害作用を検討した。
【方法】米および酒粕は市販品を使用し、米ぬかタンパクは、脱脂ぬかを材料に、アルカリ抽出および酸沈殿にて調製した。米由来タンパク（米、酒粕、米ぬか）を、市販酵素であるウマミザイム G、デナチーム AP あるいはビオプラーゼ SP によって消化し、凍結乾燥することによって、各種米由来タンパク加水分解物を得た。また、DPP-4 は、ヒト腎由来 cDNA をテンプレートに、PCR にて得られた DNA を菌体外発現用ベクター（pPICZα）に組み込み、メタノール資化性酵母（*Pichia pastoris* KM71H）を宿主に発現を行い、その培養上清を透析して用いた。DPP-4 阻害試験は、Ala-Pro-pNA を基質として測定した。
【結果】米タンパクおよび酒粕/デナチーム加水分解物、米ぬか/ウマミザイム G およびビオプラーゼ SP 消化ペプチドの DPP-4 活性に対する $IC_{50}$ (mg/mL)は、それぞれ 1.5±0.1、27.6±5.8、2.3±0.1、26.4±2.3 であり、米タンパク/デナチーム加水分解物が最も高い阻害活性を示した。米タンパク/デナチーム加水分解物を、ゲルろ過カラム（Superdex peptide）を用いて分析した結果、その最大分子量は、約 150 であった。活性成分を同定するため、分画を行ない、LC-MS 分析したところ、プロリン含有ジペプチドである Met-Pro（分子量 247）、Val-Pro（分子量 215）、Leu-Pro および Ile-Pro（いずれも分子量 229）が検出された。また、米タンパク/デナチーム加水分解物中の Met-Pro、Val-Pro、Leu-Pro、Ile-Pro 含有量はそれぞれ 1.2、0.2、1.6、1.9 μg/mg であった。そこで市販の Xaa-Pro ジペプチド 15 種類について、DPP-4 阻害活性を検討した。その結果、15 種類の中で、最も強い阻害活性を示すものは、Ile-Pro であり、その $IC_{50}$ 値は、0.41±0.07 mM であった。また、そのレトロペプチドである Pro-Ile は、DPP-4 に対して、まったく阻害活性を示さなかった。

dipeptidylpeptidase-4, rice-derived protein, hydrolysate

講演番号：3A07p04
講演日時：3 月 19 日 14:45～ A 校舎 07 会場

# 消化管オルガノイドに対するアミノ酸の影響

Effect of amino acids on intestinal organoids

○齋藤 由季、岩槻 健、羽生 ひかる、丸山 奈月、只石 幹、清水 誠、服部 一夫（東農大応生科）
○Yuki SAITO, Ken Iwatsuki, Hikaru Hanyu, Natsuki Maruyama, Miki Tadaishi, Makoto Shimizu, Kazuo Hattori (Tokyo University of Agriculture)

【背景・目的】近年、幹細胞や幹細胞から分化した吸収上皮細胞、内分泌細胞、ゴブレット細胞、パネート細胞が存在する消化管オルガノイド培養系が開発された。ここ数年で消化管オルガノイド培養系を用いた研究は増加傾向にあるが、同培養系を用いた食品成分の影響についての研究はほとんどない。そこで我々は、消化管オルガノイド培養系を用いた食品成分の影響に着目し、研究を進めてきた[1)]。今回は、特定のアミノ酸を欠乏させた培地を用いて、消化管オルガノイドに与えるアミノ酸の影響を検討した。

【方法】C57BL/6J マウスの空腸よりクリプトを単離し、オルガノイド培養に供した。培養したオルガノイドを継代した日を Day 0 とし、そのまま通常の培地を用いて Day 3 まで培養した。Day 3 にて別のチャンバーにオルガノイドを移し替え、通常（完全）培地あるいは 20 種類の各アミノ酸を欠乏させた培地で培養を継続した。24 時間培養後（Day 4）に EdU による増殖活性試験を行い、欠乏の影響が観察されたアミノ酸については、Lgr5（幹細胞マーカー）-EGFP マウスから作製した空腸オルガノイドを用いて、Day 3 から Day 4 にかけての Lgr5 発現のタイムラプス観察を行った。

【結果・考察】20 種類の各アミノ酸欠乏培地を用いた EdU 増殖活性試験を行った結果、メチオニン欠乏培地（(−)Met）において顕著な増殖活性の低下が認められた。この増殖活性の低下が、(−)Met に起因するのかを確認するために、完全培地（Con), (−)Met, (+)Met（欠乏培地に規定量のメチオニンを加えた培地）で EdU による増殖活性試験を行い検討した。その結果、(−)Met に比して（+)Met では Con と同様の増殖活性が観察され、Met 除去が細胞の増殖活性を低下させたことが示された。次にメチオニンが消化管オルガノイド中のどの細胞に影響を及ぼしたのかを調べるため、Lgr5-EGFP 空腸オルガノイドの 24 時間タイムラプス観察を行った。その結果、Con に比して (−)Met では、EGFP の蛍光を発する細胞数の減少が認められた。また、オルガノイドの形態に関しては、Con に比して (−)Met において budding が抑制されていた。以上より、メチオニンは空腸オルガノイドの増殖に必要なアミノ酸であることが示唆された。現在、内分泌細胞のような機能細胞への分化に及ぼすメチオニンの影響を明らかにするために、Ngn3（内分泌前駆細胞マーカー）-EGFP 空腸オルガノイドを用いた系を検討中である。

1）齋藤ら、日本農芸化学会 2016 年度大会

intestinal organoids, amino acids, stem cells

講演番号：3A07p05
講演日時：3 月 19 日 15:00～ A 校舎 07 会場

# レジスタンス運動におけるγ-アミノ酪酸（GABA）とホエイプロテイン共摂取による筋肥大へ与える効果

# Combined oral intake of GABA with whey protein improves lean mass in resistance-trained men

○坂下 真耶[1]、中村 唱乃[1]、堀江 健二[1]、堀江 典子[1]、横山 靖浩[2]、金 武祚[1]、藤田 聡[3]（[1]（株）ファーマフーズ、[2]三菱商事（株）、[3]立命館大学・スポーツ健康科学）
○ Maya SAKASHITA[1], Utano NAKAMURA[1], Kenji HORIE[1], Noriko HORIE[1], Yasuhiro YOKOYAMA[2], Mujo KIM[1], Satoshi FUJITA[3] ([1]Pharma Foods International Co., LTD., [2]Mitsubishi Corp., [3]Sport and Health Science, Ritsumeikan Univ.)

【目的】

γ-アミノ酪酸（Gamma aminobutyric acid, GABA）はアミノ酸の一種であり、野菜、穀物、発酵食品等に広く含まれる成分である。これまでに、GABA を摂取することで、安静時の血漿中において、成長ホルモン（Growth hormone, GH）が上昇することが報告されている。GH は骨や筋肉の合成を促し、体を構成する上で非常に重要な役割を担っている。GABA の GH 産生促進効果は明らかになっているが、GABA の筋肉における詳細な機能については未だ明らかになっていない。一方、骨格筋における筋肥大を促進する方法として、レジスタンス運動後のタンパク質摂取が広く知られている。また、様々なタンパク質源の中でも、ホエイプロテインは筋肥大を促進する最も効果的なタンパク質として報告されている。そこで、本研究では、レジスタンス運動後にホエイプロテインと GABA を共摂取することで、ホエイプロテイン単独摂取に比べて、さらに筋肥大を促進するかどうか、ヒトにおける検証を行った。

【方法】

健常な男性 26 名（26-48 歳）を対象とし、ホエイプロテイン単独摂取（WP）群、およびホエイプロテイン+GABA 共摂取（WP+G）群の 2 群に分けた。WP 群にはホエイプロテイン 10 g、WP+G 群にはホエイプロテイン 10 g と GABA 100 mg を毎日、12 週間摂取させた。摂取期間中、週 2 回の筋力トレーニング（ベンチプレスなど 5 種）を実施した。試験開始時および試験開始 12 週間後（試験終了時）に、体組成を二重エネルギーX 線吸収測定（DXA）法にて測定した。また、試験開始時、試験開始 4 週間後、8 週間後、12 週間後に、血漿中 GH 濃度を ELISA 法にて測定した。

【結果・考察】

WP+G 群において、血漿中の GH 濃度が試験開始時に対して、試験開始 4 週間後、8 週間後に有意な上昇を示した（$p<0.05$）。一方、WP 群では、試験開始時に対して、試験開始 8 週間後のみ、有意な上昇を示した（$p<0.05$）。体組成を測定した結果、WP+G 群では 12 週間で全身の非脂肪量が 1,340 g 増加し、一方、WP 群では 146 g の増加を示し、WP+G 群は WP 群に対して、非脂肪量を有意に増加させる結果が認められた（$p<0.05$）。以上の結果より、レジスタンス運動後のホエイプロテイン摂取に、GABA を組み合わせることで、安静時における GH 濃度を上昇させ、ホエイプロテイン単独摂取に比べて、効果的に筋肥大を促進する効果が示唆された。

GABA, protein, muscle

講演番号：3A07p06
講演日時：3 月 19 日 15:25～ A 校舎 07 会場

# レチノイン酸受容体γ応答遺伝子が骨格筋肥大に及ぼす影響

# Effects of the retinoic acid receptor gamma-responsive genes on skeletal muscle hypertrophy

○北風 智也[1]、嶋田 有沙子[1]、原田 直樹[1]、石川 孝博[2]、山地 亮一[1]（[1]大阪府大院・生命環境、[2]島根大・生資科・生命工）
○Tomoya KITAKAZE[1], Asako SHIMADA[1], Naoki HARADA[1], Takahiro ISHIKAWA[2], Ryoichi YAMAJI[1]（[1]Osaka Pref. Univ., [2]Shimane Univ.）

【目的】骨格筋はサイトカインを含む液性因子を分泌し、オートクライン的に作用させることで筋分化あるいは筋肥大を引き起こす。骨格筋量はタンパク質の合成と分解のバランスで調節されており、タンパク質の合成が分解を上回ると筋重量は増加する。我々はこれまでに、プロビタミン A である β-カロテンを摂取したマウスの骨格筋では、転写因子であるレチノイン酸受容体γ（RARγ）を介してタンパク質合成が促進し、筋重量が増加することを明らかにしてきた。しかしながら RARγを介してどのようにタンパク質合成が増加するかは不明である。本研究では骨格筋における RARγ応答遺伝子を探索し、筋肥大に関わる因子を同定することを目的とした。
【方法・結果】マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞を筋管細胞に分化させた後、β-カロテンまたはレチノイン酸（ATRA）存在下で培養し、タンパク質合成の指標である mTOR と p70S6K のリン酸化レベルを評価した。β-カロテンまたは ATRA は、120 分までの培養では mTOR と p70S6K のリン酸化に影響を及ぼさなかったが、24 時間培養時には mTOR と p70S6K のリン酸化レベルを増加させた。これらの結果から、RARγを介したタンパク質合成が、遺伝子の転写を介したゲノミックな作用によるものと推測した。そこで、RARγに応答して発現の増加する分泌因子がタンパク質合成を促進するか検討したところ、C2C12 筋管細胞をβ-カロテンまたは ATRA で刺激して得られた培養上清（CM）がタンパク質合成や mTOR と p70S6K のリン酸化レベルを増加させることが判明した。一方で、RARγ特異的な siRNA を処理した細胞をβ-カロテンまたは ATRA で刺激して得られた CM ではタンパク質合成を促進しなかった。さらに、CM 中の 10-100 kDa サイズの物質がタンパク質合成を促進することが判明した。これらの結果から、RARγの活性化は 10-100 kDa の分泌性因子を介してタンパク質合成を促進することが明らかとなった。C2C12 筋管細胞における RARγ応答遺伝子を探索するため、ATRA で刺激後の筋管細胞を RNA-seq に供した。ATRA によって発現の上昇した分泌性因子を解析した結果、トランスグルタミナーゼ 2（TGM2）が候補遺伝子として得られた。TGM2 は C2C12 細胞において、β-カロテンまたは ATRA の濃度依存的に mRNA レベル、タンパク質レベルで発現量が増加した。TGM2 はβ-カロテンを摂取したマウスのヒラメ筋で発現が上昇したが、RARγ特異的な siRNA の投与によって増加が抑制された。C2C12 細胞で TGM2 を高発現させた結果、筋構成タンパク質であるミオシン重鎖の発現増加を伴う筋肥大を促進した。以上の結果から、TGM2 は筋肥大を促進する RARγ応答遺伝子であることが示唆された

skeletal muscle, protein synthesis, retinoic acid receptor

講演番号：3A07p07
講演日時：3 月 19 日 15:40～ A 校舎 07 会場

# β - コングリシニンの摂取が高血圧自然発症ラットの血圧および脂質濃度に及ぼす影響

# Effects of dietary βconglycinin on blood pressure and lipid metabolism in spontaneously hypertensive rats

○川邊田 晃司[1]、岩永 ひかり[2]、岡田 愛子[2]、湯浅 正洋[2]、古場 一哲[1,2] ([1]長崎県大院 人間健康科学 、[2]長崎県立大 栄養健康)
○Koji Kawabeta[1], Hikari Iwanaga[2], Aiko Okada[2], Masahiro Yuasa[2], Kazunori Koba[1,2] ([1]Grad sch of Human Health Science, Univ of Nagasaki, [2]Dep of Nutrition Science, Univ of Nagasaki)

【背景・目的】

これまでに大豆タンパク質は血漿および肝臓のトリアシルグリセロール（TG）濃度を低下させることが知られている。これは大豆タンパク質の主要成分の一つである β-コングリシニン（β-CON）による効果と考えられている。β-CON の摂取は、血漿アディポネクチン濃度を上昇させることが示唆されている。アディポネクチンは脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインのひとつであり、脂質代謝改善作用を有するだけでなく、血圧上昇抑制因子であることも示唆されている。したがって β-CON は脂質代謝に加え血圧調節にも影響する可能性がある。そこで本研究では、β-CON 摂取による血圧および脂質代謝への影響について検討した。

【方法】

カゼインを 20%含む AIN-93G 組成の純化食を調製し対照食とした。対照食のカゼインの半量を大豆タンパク質（SOY）または β-CON で置き換えた実験食を調製した。実験動物として、5 週齢の雄性高血圧自然発症ラット（SHR/Izm）を用い、1 週間の予備飼育後、1 群 6 匹で 3 群に分け、それぞれの食餌を 6 週間自由摂食させた。飼育期間中、2 週間毎にラットの尾部の血圧を測定した。飼育期間終了後、大動脈採血し、肝臓、腎臓、各脂肪組織を摘出し、重量を測定した。血漿および肝臓の脂質濃度、肝臓の脂質代謝関連酵素活性、肝臓および腎臓の血圧調節因子の遺伝子発現を測定した。

【結果および考察】

血圧は、飼育開始 4 週目以降 CAS 群に比べ SOY 群および β-CON 群で有意に低い値を示した。血漿アディポネクチン濃度は、CAS 群、SOY 群、β-CON 群の順で高値を示し、血圧への関与が示唆された。血漿中のアンジオテンシン変換酵素（ACE）活性は 3 群間で違いはなかったものの、肝臓のアンジオテンシノーゲン発現および腎臓のレニン発現は、CAS 群に比べ SOY 群および β-CON 群で低い傾向を示した。血漿 TG 濃度は、3 群間で違いはなかったものの、肝臓 TG 濃度は、CAS 群に比べ SOY 群で有意に低く、β-CON 群でも同様に低下傾向がみられた。この効果には SOY および β-CON 摂取による肝臓サイトソールの脂肪酸合成酵素活性の低下が一因と考えられた。このことから、β-CON 摂取は脂質代謝改善作用に加え、血圧上昇抑制作用も示し、その作用には少なくとも血漿アディポクネチン濃度およびレニン-アンジオテンシン系が関与していることが示唆された。

βconglycinin, blood pressure, rat

講演番号：3A07p08
講演日時：3 月 19 日 15:55～ A 校舎 07 会場

脳梗塞重症化予防効果を持つ食品成分探索のための新規バイオマーカーの開発
Development of novel biomarkers for finding food components with the effect of preventing cerebral infarction

○田熊 彩子[1]、齊藤 芳和[1]、阿部 新[2]、石丸 喜朗[1]、上田 雅之[4]、仁藤 智香子[2]、木村 和美[2]、阿部 啓子[1,3]、朝倉 富子[1] ([1]東大院・農生科、[2]日医大、[3]KAST、[4]多摩総医セ)
○Ayako TAKUMA[1], Yoshikazu SAITO[1], Arata ABE[2], Yoshiro ISHIMARU[1], Masayuki UEDA[4], Chikako NITO[2], Kazumi KIMURA[2], Keiko ABE[1,3], Tomiko ASAKURA[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Nippon Medical School, [3]KAST, [4]Tokyo Metropolitan Tama Medical Center)

[背景・目的] 現在、日常的に摂取することで脳梗塞発症時の悪化を防ぎ、後遺症の軽減をもたらす化合物の探索が行われている。しかしそれらの多くの作用機序は不明であり、また食品にも効果のある物質が含まれると期待される。そこで、脳梗塞による体内変化を明らかに出来れば、新規活性物質を探索する際の指標となり、新たな食品成分の探索に生かすことが可能となる。また、活性成分の評価にはこれまで脳切片を染色するという侵襲的な方法が用いられてきたが、脳梗塞の状態を反映する血中成分が見つかれば予後の継時的な変化を非侵襲的に観察できる。特に、microRNA は血中に安定して存在する因子で、バイオマーカーとしての利用が期待されている。本研究では脳梗塞によって生じる血中の遺伝子発現の変化を解析し、脳梗塞による生体内変化を観察するとともに、新規血中バイオマーカーとしての miRNA を探索することを目的として行った。
[方法・結果・考察] SD 系雄性ラットを用い、血管を詰まらせる糸を血管に挿入する脳梗塞手術群と、血管を詰まらせない細い糸を血管に挿入する Sham 手術群の各 3 匹を作製した。再灌流から 24 時間後に脳と血液を採取し、脳切片を 2,3,5-Triphenyl tetrazolium chloride で染色して、脳梗塞手術群で見られる細胞の死滅が Sham 手術群では見られないことを確認した。全血から TRIzol LS Reagent を用いて全 RNA を抽出し、mRNA は GeneChip Rat Genome 230 2.0 Array、miRNA は GeneChip miRNA 4.0 Array を用いてマイクロアレイ解析を行った。mRNA に関しては統計ソフト R を用いて DFW 法で正規化したのちに Rank Products 法で 2 群間比較を行ったところ、FDR<0.05 を満たす発現変動遺伝子として 232 プローブセットが抽出された。Ingenuity Pathway Analysis で解析を行ったところ免疫関連パスウェイの抑制が見られ、また発現変動遺伝子のうち免疫に関わる CD 分子が発現低下していた。このことから脳梗塞後に免疫力の低下が起こり感染症等の罹患率が上がると考えられる。miRNA に関しては Affymetrix Transcriptome Analysis Console Software を用いて解析を行ったところ、pvalue<0.05 かつ|Fold Change|≧1.5 を満たす 7 つの miRNA が抽出された。そのうち 3 つの成熟 miRNA についてデータベース miRDB 上の標的遺伝子と血中 mRNA の発現変動遺伝子で共通するものがあった。それらの発現は逆相関の関係にあり、これらの miRNA が mRNA の発現を抑制しているという機構が示唆された。抽出された 7 つの miRNA は、脳梗塞の状態を反映したバイオマーカーとして今後の利用が期待される。
[謝辞] 本研究は、総合科学技術・イノベーション会議の SIP (戦略的イノベーション創造プログラム)「次世代農林水産業創造技術」によって実施されました。

stroke, biomarker, microrna

発表責任者：朝倉富子（asakura@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A07p09
講演日時：3 月 19 日 16:10～ A 校舎 07 会場

# 老化促進マウスにおけるカルノシン酸の肝臓及び腎臓保護効果

# The effect of orally administered carnosic acid on liver and kidney in senescence-accelerated mouse

○柴田 紗知[1]、石飛 博之[2]、奥田 真友美[1]、味八木 茂[2]、萱島 知子[3]、川岡 知博[4]、松原 主典[1]([1]広島大・院　教育、[2]広島大病院・未来医療センター、[3]佐賀大・文化教育、[4]川岡クリニック)
○ SACHI SHIBATA[1], HIROYUKI ISHITOBI[2], MAYUMI OKUDA[1], SHIGERU MIYAKI[2], TOMOKO KAYASHIMA[3], TOMOHIRO KAWAOKA[4], KIMINORI MATSUBARA[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]Hiroshima Univ Hosp., [3]Saga Univ., [4]Kawaoka CL.)

【目的】シソ科のハーブ ローズマリーの主な機能成分であるカルノシン酸(Carnosic acid)は，抗酸化作用や Keap1-Nrf2 系を介する酸化ストレス生体防御機能活性化作用が報告されている。我々は，2013 年度本大会にて，カルノシン酸の新規機能として，脳神経細胞保護効果とその作用機構を報告した。さらに加齢に伴う脳機能低下に対する予防効果を検証するために，老化促進マウスへのカルノシン酸の長期経口投与を進めた。その結果，カルノシン酸摂取による脳機能保護効果を見出し，昨年度の本大会において報告した。他の臓器への有効性も期待されたため，カルノシン酸摂取による肝臓及び腎臓への影響について検討を進めた。
【方法】マウスへの投与実験は，老化促進マウス(senescence-accelerated mice; SAM)のうち，早期学習記憶障害モデル動物として確立された SAM P8 系を用いて検討した。12 ヶ月に亘ってカルノシン酸(50 μM)溶液の投与を行い，コントロール群には蒸留水を与えた。飼育終了後に，肝臓及び腎臓を回収し，血液生化学検査，組織染色，ウエスタンブロット・定量 RT-PCR を用いた解析等でカルノシン酸摂取による肝臓及び腎臓への影響を検討した。
【結果】肝臓におけるタンパク質発現についてウエスタンブロット法を用いて検討した結果，カルノシン酸投与群で抗酸化系酵素発現を制御する転写因子 FoxO3a のリン酸化が有意に抑制されることが明らかになった。このことは，カルノシン酸摂取により FoxO3a が転写因子として働き，抗酸化機能が高まったことを示している。実際，カルノシン酸投与群において，FoxO3a の制御を受けている SOD2 は増加する傾向にあった。一方で，HO-1 には差が認められなかった。肝臓での遺伝子発現について定量 RT-PCR 法で検討したところ，FoxO3a と HO-1 はカルノシン酸投与群において発現がわずかに上昇しているものの有意な差は見られなかった。一方，SOD2 の発現量はカルノシン酸投与群において有意に上昇していた。腎臓機能について血液生化学検査によって検討した結果，クレアチニン値がコントロール群と比べカルノシン酸投与群は有意に低いことが分かった。さらに，腎臓について HE 染色で検討したところ，コントロール群では尿細管で炎症が見られたものの，カルノシン酸投与群では炎症が抑えられていることが分かった。更に免疫染色法で検討した結果，FoxO3a のリン酸化がカルノシン酸投与群では抑制され，Catalase や SOD2 の発現が増加していることも確認された。
　以上の結果から，老化促進マウスにおいて，カルノシン酸摂取により FoxO3a の活性化を介して肝臓及び腎臓保護効果を示すことが明らかになった。

Carnosic acid, SAMP8, FoxO3a

講演番号：3A07p10
講演日時：3 月 19 日 16:25～ A 校舎 07 会場

# 老化促進マウスにおける酒粕機能成分の抗老化効果及び作用機構の検討

# The effect and the mechanism of bioactive compounds derived from sake cake on aging in senescence-accelerated mouse

○奥田 真友美[1]、柴田 紗知[1]、飯島 遼平[2,3]、伊豆 英恵[2]、藤井 力[2,3]、松原 主典[1]([1]広島大院・教育、[2]酒総研、[3]広島大院・生物圏)
○Mayumi OKUDA[1], Sachi SHIBATA[1], Ryohei IIJIMA[2,3], Hanae IZU[2], Tsutomu FUJII[2,3], Kiminori MATSUBARA[1] ([1]Hiroshima Univ. Education, [2]NRIB, [3]Hiroshima Univ. Biosphere)

【目的】近年，発酵食品の健康機能が注目されている。我々は，醸造副産物で和食素材でもある酒粕に含まれる機能成分に注目し，老齢疾患予防効果について検討を進めている。これまでに，グリセロホスホコリン（GPC）の経口摂取が老化促進マウスにおいて脳機能保護効果を示すことを見出している。酒粕には GPC 以外にも多彩な生理機能を持つ成分が含まれており，なかでも S-アデノシルメチオニン（SAM）は脳機能への有用性が示されている。そこで，本研究では SAM と GPC の単独摂取に加え，両成分の同時摂取による効果を検討した。また，両成分の脳機能保護効果については，アルツハイマー病との関連で注目されているトランスサイレチン（transthyretin: TTR）によるアミロド形成抑制や TTR の安定化作用についても検討を行った。
【方法】早期老化・学習障害モデル動物である老化促進マウス P8 系（SAMP8，オス，各群 10 匹）に，1）SAM 溶液（10 mg/100 ml）・2）GPC 溶液（7 mg/100 ml）・3）SAM+GPC 溶液・4）水（対照群）を与え，老化への影響を検討した。SAM 及び GPC の投与は 4 週齢から 45 週齢まで行い，飼料は固形試料を自由摂取させた。評価は，外観・脳機能（行動解析）・血液分析・組織化学解析により行った。TTR への影響については，脳での免疫染色と熱安定化作用について検討した。
【結果】老化に伴う外観の変化は，40 週齢までは SAM や GPC の摂取により抑制されたが，その後差がなくなっていった。脳機能に関する行動科学試験では，新奇物体認識試験において SAM と GPC の同時摂取が有効であることが示された。また，25 週齢時の血液検査でも絶食によって生じる異常な低血糖が SAM と GPC の同時摂取によって抑制された。しかしながら，45 週齢時の血液検査では血糖値や肝機能では明確な保護効果は認められなかった。同様に，組織化学評価でも肝臓及び腎臓における SAM や GPC 摂取の保護効果は認められなかった。脳について TTR 免疫染色によって評価したところ，対照群に比べ SAM や GPC の摂取群において染色が弱く脳血管保護効果が示唆された。また，SAM と GPC の同時摂取により TTR の沈着が抑制される傾向がみられた。しかしながら，SAM や GPC は直接 TTR を安定化する作用は認められなかった。SAM や GPC の摂取による TTR の沈着抑制は脳血管保護効果によるものであることが示唆され，それが脳機能保護に働いている可能性が示された。

本研究は SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施された。

Anti-aging, Sake cake, Transthyretin

講演番号：3A07p11
講演日時：3 月 19 日 16:50～ A 校舎 07 会場

テオフィリンによるグルココルチコイド受容体を介した IL-6 の発現抑制作用
Effect of theophylline on the suppression of IL-6 products by glucocorticoid receptor signaling
○三谷 塁一[1]、片山 茂[2]、中村 宗一郎[2] ([1]信州大・先鋭領域融合、[2]信州大院・総合理工(農学))
○Takakazu MITANI[1], Shigeru KATAYAMA[2], Soichiro NAKAMURA[2] ([1]Shinshu Univ. ICCER, [2]Shinshu Univ)

【目的】欧米諸国や日本を中心とした先進国だけでなく、発展途上国の多くで過食と運動不足による肥満が増しており、それによって誘発される生活習慣病患者の増加が社会問題となっている。肥満状態の脂肪組織は慢性炎症状態であり、慢性炎症状態の脂肪細胞から分泌される炎症性アディポカインは、他組織のインスリン抵抗性を惹起し、糖尿病へと発展することが知られている。つまり、脂肪細胞から分泌される炎症性アディポカインの産生を抑制することは糖尿病の予防に繋がると考えられる。本研究では、茶葉に微量含有されるメチルキサンチン類のテオフィリンが炎症性アディポカインである IL-6 の産生と発現に及ぼす影響を解析した。
【方法】マウス線維芽細胞（3T3-L1）をインスリン、デキサメタゾン、イソブチルメチルキサンチンを処理することで脂肪細胞へと分化誘導を行い、テオフィリンが IL-6 の発現と産生に及ぼす影響を qPCR 法と ELISA 法で定量した。テオフィリンに EAH Sepharose を結合することでテオフィリン結合担体を作製し、テオフィリンと相互作用する 3T3-L1 細胞中のタンパク質を探索した。6 週齢の雄性 ICR マウスにグルココルチコイドであるコルチコステロン（CORT）の含有水（100 μg/mL）とテオフィリン混合食（0.1% w/w）を 6 週間自由摂取させ、血中の IL-6 量と脂肪組織中での IL-6 の発現量を解析した。
【結果および考察】合成グルココルチコイドであるデキサメタゾンは 3T3-L1 細胞において IL-6 の産生を増加し、テオフィリンは、デキサメタゾンによる IL-6 の発現を遺伝子レベルで抑制することが示された。さらに siRNA を用いた結果から IL-6 の発現は核内受容体の一種であるグルココルチコイド受容体（GR）によって調節されていることが明らかとなった。テオフィリンは GR の発現量に影響を示さなかったが、核内の GR の蓄積を抑制した。テオフィリン結合担体と 3T3-L1 細胞の抽出物を混合し、プルダウンアッセイを行なった結果、テオフィリンは GR と相互作用することが示された。CORT を摂取したマウスにおいて血中および脂肪組織における IL-6 量は増加し、同時にテオフィリンを摂取させることで、CORT による IL-6 の増加が抑制された。さらに、CORT 摂取により空腹時血糖値の増加が認められたが、テオフィリン摂取群では、CORT による空腹時血糖値の増加も抑制された。以上の結果から、テオフィリンは、脂肪細胞での GR の活性を抑制することで IL-6 の発現を抑制することが示され、テオフィリンが脂肪細胞を標的としてインスリン抵抗性を緩和する食品成分であることが示唆された。

adipocyte, interleuikin-6, glucocorticoid

発表責任者：三谷塁一（mitani@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3A07p12
講演日時：3 月 19 日 17:05～ A 校舎 07 会場

# 酸味受容体(ASICs)タンパクをセンサーとした酸味抑制物質のスクリーニング

# Screening of Substances Repressing Sour taste using Electrophysiological Assay with ASICs

○玉村 朋大[1]、柴田 泰宏[2]、塚本 義則[1]、鵜川 眞也[2] ([1]中部大院応生、[2]名市大院医)
○Tomohiro TAMAMURA[1], Yasuhiro SHIBATA[2], Yoshinori TSUKAMOTO[1], Shinya UGAWA[2] ([1]Chubu Univ., [2]Nagoya City Univ.)

近年、日本では食の欧米化等に伴って生活習慣病に対する懸念が益々深まりつつある。このような中、近年食酢の長期摂取(15mL/day×10weeks)により、血液中のトリグリセリドや内臓脂肪の低下、血圧の低下効果等がヒト介入試験で検証されてきており、食事を通しての日常的な摂取が生活習慣病予防において有効な手段に取り上げられている。しかしながら、食酢特有の刺激的な酸味が要因となって食酢の長期的摂取は容易ではなく広く実施されているとは言い難い状況にある。そこで我々は、食酢の日常的摂取及び長期的摂取をより容易にする手段としての酸味を抑制する安心・安全な物質の開発を目的とし、酸味受容体(ASICs:Acid Sensing Ion Channels)タンパクをセンサーとする電気生理学的アッセイ法を用いて酸味抑制物質の自然界からのスクリーニングを試みた。方法として、アフリカツメガエル卵母細胞に human ASICs の cRNA をインジェクションし、卵母細胞に ASICs を発現させたものを電気生理学的にタンパク質の活性を確認した。酸に対する反応の結果として、塩酸系での試験及び酢酸系での試験の両方において ASICs の活性を抑制する物質 2 種類を確認できたので報告する。

ASICs, Electrophysiological Assay, Sour Taste

講演番号：3A07p13
講演日時：3 月 19 日 17:20～ A 校舎 07 会場

# カシスアントシアニンによる神経細胞障害保護作用の検討

# Investigation of mechanisms of improvement in neuronal cell dysfunction by black currant anthocyanins

○上野 有紀、三浦 叶子、夏目 梨冴、大澤 俊彦 (愛知学院大心身科学)
○Yuki UENO, Kyoko MIURA, Risa NATSUME, Toshihiko OSAWA (Aichi Gakuin Univ.)

＜目的＞

我々の研究グループは、これまでにカシスジュース製造過程で生成する食物繊維を多く含むカシス抽出物の肥満・糖尿病モデル動物への作用として、血清脂質の低下、抗酸化酵素誘導などを明らかにしてきた。カシスの生理作用として、様々な活性が報告されているが、神経変性疾患への影響についてはまだ不明な点が多い。本研究では、カシスに含まれる主要なアントシアニンによる神経細胞障害の保護作用を検討することを目的とした。

＜方法＞

１．細胞生存率測定

ヒト神経細胞株SH-SY5Yは96ウェルプレートにて一晩培養した。カシスアントシアニンを各濃度となるよう添加し一晩培養後、300μM 過酸化水素または200μM 6-OHDAを添加しさらに一晩培養した。生細胞数はCell Counting Kit-8（同人化学研究所）を用いて測定し、細胞生存率を求めた。

２．DNAマイクロアレイ

SH-SY5Yを6cmシャーレで一晩培養後、各種のカシスアントシアニン添加培地で24時間培養した。細胞からtotal RNAを抽出し、cDNA合成、aRNA合成・断片化後、DNAマイクロアレイとハイブリダイゼーションし、蛍光検出した。

＜結果・考察＞

SH-SY5Yにおいて過酸化水素または6-OHDAとカシスアントシアニンを投与した時の細胞生存率は、過酸化水素または6-OHDAのみ投与と比較して有意に改善した。またSH-SY5Yにおいて、カシスアントシアニンによる遺伝子発現誘導プロファイルをDNAマイクロアレイにより検討したところ、デルフィニジンおよびその配糖体よりもシアニジンおよびその配糖体は強力に発現誘導した。またシアニジンおよびその配糖体は、抗酸化酵素遺伝子など多数の遺伝子の発現を増強させた。現在、カシスアントシアニンによる神経細胞保護作用の解明に向けて、さらに詳細な検討を行っている。

SH-SY5Y, black currant, anthocyanin

発表責任者：上野有紀（ueno@dpc.aichi-gakuin.ac.jp）

講演番号：3A07p14
講演日時：3 月 19 日 17:35～ A 校舎 07 会場

# GABA、クワンソウ、及びラフマ抽出物の共摂取による睡眠改善効果

# The improvement of sleep by the combined intake of GABA, extract of Hemerocallis fulva, and extract of Apocynum venetum

○山津 敦史[1]、中村 唱乃[1]、坂下 真耶[1]、堀江 健二[1]、堀江 典子[1]、齋藤 洋子[2]、玉城 美根子[2]、金 武祚[1] ([1]（株）ファーマフーズ、[2]（株）シャルレ)
○ Atsushi YAMATSU[1], Utano NAKAMURA[1], Maya SAKASHITA[1], Kenji HORIE[1], Noriko HORIE[1], Yoko SAITO[2], Mineko TAMASHIRO[2], Mujo KIM[1] ([1]Pharma Foods International Co., LTD., [2]CHARLE CO., LTD.)

【目的】
現代人の 5 人に 1 人は慢性的な睡眠不足に悩んでおり、約 7 割の人は睡眠に何かしらの問題があると答えている（厚生労働省調べ平成 25 年度、26 年度)。我々はこれまでに GABA（γ-アミノ酪酸）の睡眠の質改善効果について報告してきた。そこで今回 GABA と、睡眠改善効果があるといわれているクワンソウ（*Hemerocallis fulva*）抽出物、ラフマ（*Apocynum venetum*）抽出物を共摂取した時の睡眠の質などの主観的・客観的評価への影響について検討を行ったので報告する。

【方法】
対象者　ピッツバーグ睡眠質問票のスコアが 6 点以上の健常な成人男女 16 名を対象に試験を行った。ピッツバーグ睡眠質問票のスコアが 6 点以上の人は睡眠に問題がある可能性があるとされているが、本試験の被験者は治療を必要とするような症状のない、健康な状態であることを確認している。
試験スケジュール　就寝時に脳波計（SLEEPSCOPE）を装着し、睡眠時の脳波を測定した。翌朝、起床後すぐに起床時睡眠感調査票（OSA アンケート）を実施し、夕方に、VAS（Visual Analog Scale）アンケートを実施した。上記測定を被験物質摂取前データとした。その後 1 週間、就寝 30 分前に被験物質（GABA 100 mg、クワンソウ抽出物 15 mg、ラフマ抽出物 20 mg）を摂取した。1 週間後、睡眠時の脳波を測定し、被験物質摂取後の脳波データとした。翌日、起床後すぐに OSA アンケートを実施し、夕方に VAS アンケートを実施した。当試験は、無作為化二重盲検プラセボ対照クロスオーバー試験である。

【結果・考察】
脳波データにおいて、GABA+クワンソウ+ラフマ群ではノンレム深睡眠潜時、δパワー値がプラセボ群に対して有意に改善した（$P< 0.05$)。主観的評価では、寝つくまでの時間、夜中に目が覚める頻度といった入眠や睡眠維持に関する項目でプラセボ群に対して有意な改善効果が認められた（$P< 0.05$)。また、日中の疲労感もプラセボに対して有意に改善した（$P< 0.05$)。これらの結果より、GABA、クワンソウ、ラフマの共摂取に「寝つきを促し、速やかに深い眠りへ誘い、睡眠の質を改善する。さらに翌日の疲労感を軽減する」という機能があることが示唆された。

sleep, Non-REM sleep, delta wave

講演番号：3A07p15
講演日時：3 月 19 日 17:50～ A 校舎 07 会場

# パッションフラワー抽出物による概日リズム振幅増強作用及び睡眠改善作用

# Passionflower extract positively modulates circadian rhythms and improves a sleep.

戸田 一弥、竹田 翔伍、清水 稔仁、○下田 博司（オリザ油化）
Kazuya Toda, Shogo Takeda, Norihito Shimizu, ○Hiroshi Shimoda (ORYZA OIL & FAT CHEMICAL)

【 目的 】概日リズムは睡眠・覚醒サイクル等の生理機能や行動機能の制御において重要な役割を担っている．これまでに演者らはヨーロッパを中心に抗不安作用を示すハーブとして伝統的に用いられてきたパッションフラワー（*Passiflora incarnata* L.）の抽出物（PFE）及び含有成分（homoorientin 等）がマウス線維芽細胞株 NIH3T3 に対して時計遺伝子(Per1,Per2,Cry1)の発現周期を変えずに振幅を増強することを明らかにしている．そこで，本研究では PFE がマウスにおいても同様の機能を示すか調べると共に概日リズムと関連がある睡眠に及ぼす影響を評価した．
【 方法 】6 週齢の ICR 雄マウスに PFE（100 mg/kg/day)を 15 日間経口投与した．16 日目にペンタバルビタール誘発睡眠試験を実施し,睡眠に及ぼす影響を評価した.その後,所定の時間(zeitgeber time 0, 6, 12, 18h）経過後に大脳，視床下部，肝臓及び血清を回収した．時計遺伝子の発現周期及び発現振幅に及ぼす影響を評価するため，RT-PCR 法にて時計遺伝子の mRNA 発現量を定量した．また，ホルモン系の概日リズムへの影響を評価するため，血中コルチコステロン量は ELISA 法にて，モノアミンは HPLC 法にて，モノアミン・GABA 代謝関連酵素の mRNA 発現量は RT-PCR 法にて定量した．
【 結果および考察 】ペンタバルビタール誘発睡眠試験において PFE はポジティブコントロールであるムシモール（0.2 mg/kg, *i.p.*）と同様に睡眠潜時を短縮し，睡眠時間を延長したことから，睡眠改善作用があることが判明した．また，PFE は肝臓において Per1，Per2，Cry1 の mRNA 発現周期を変更せずに振幅を増強した．この結果は NIH3T3 を用いた細胞試験と同じ結果であった．しかし，大脳では Bmal1，Clock の発現振幅が増強した．両組織間におけて PFE の時計遺伝子の発現に対する作用には明らかな差異が認められた．この差異に関して，演者らは概日リズムに影響を及ぼす一部のモノアミンや GABA が関与していると考えた．実際に，大脳のドーパミン分泌リズム振幅が増強し，代謝関連酵素（MAO，COMT，GAD)の発現量が有意に変動していた．また，血中コルチコステロン量の振幅も時計遺伝子の発現と同様に増強した．以上の結果から，PFE はマウスにおいても細胞試験の結果と同様に概日リズムの周期を変えずに振幅を増強する作用を有すると考えられた．
【 結論 】細胞及びマウスの試験結果から，PFE には概日リズムの振幅を増強する作用及びそれを作用機序の一部とする睡眠改善作用を有することが明らかになった．また，これまでに演者らは PFE 中の homoorientin 等の一部のフラボノイド配糖体に概日リズムの振幅を増強する作用があることを明らかにしており，これらの成分が活性（概日リズムへの作用）に寄与していると考えている．

Passiflora incarnata, circadian rhythm, sleep

発表責任者：下田　博司（kaihatsu@mri.biglobe.ne.jp）

講演番号：3A07p16
講演日時：3 月 19 日 18:05～ A 校舎 07 会場

植物由来コロソリン酸の新規機能性－体内時計調節機能－
The novel effect of corosolic acid on circadian rhythms
○鈴木 千尋[1]、間 和彦[1]、小堀 真珠子[2]、大池 秀明[2] ([1]日本製粉(株)、[2]農研機構/食品研)
○CHIHIRO SUZUKI[1], KAZUHIKO AIDA[1], MASUKO KOBORI[2], HIDEAKI OIKE[2] ([1]NIPPON FLOUR MILLS CO., LTD, [2]NARO/NFRI)

【背景・目的】地球上の多くの生物には体内時計が備わっており、24 時間の明暗周期に合わせた活動リズム（概日リズム）を示す。体内時計は行動だけでなく、様々な生理現象や代謝の日内変動に関与している。その本体は時計遺伝子と呼ばれる 10 数個の遺伝子で、時計遺伝子が一定の周期で発現変動し、約 24 時間のリズムを作ると考えられている。体内時計は行動のリズムを作る中枢の脳の視交叉上核だけでなく全身の細胞に存在し、組織の代謝リズムを生む。これを末梢時計という。インスリンは細胞や動物組織の時計遺伝子の発現リズムを動かすことが報告されており、食事刺激を末梢時計に伝えるシグナルの一つであると推測されている。我々は末梢時計を調節する食品成分の探索を行い、トリテルペンの一種コロソリン酸に注目した。コロソリン酸はバナバやビワに多く含まれていて、抗炎症・抗腫瘍効果の他、インスリン受容体のリン酸化を促進することでインスリン様の血糖値低下作用を示すことが報告されている。本研究では主に、体内時計解析を目的として、代表的な時計遺伝子の一つである PER2 の概日発現リズムを利用し、コロソリン酸がインスリンシグナルを介して概日時計に与える影響を検討した。
【方法】PER2 プロモーター下にルシフェラーゼを組み込んだヒト骨肉腫由来 U2OS 細胞を用いて概日リズムへの影響を評価した。血清ショックにより個々の細胞の時計を合わせた（同調）後、細胞にコロソリン酸を添加し、発光を 10 分おきに数日間計測し連続的な発光リズムの波形を得て、概日リズムの周期長や位相などを解析した。また、Per2::Luc ノックインマウスの培養組織片についても同様に発現リズム解析を行い、コロソリン酸添加による影響を調べた。
【結果・考察】コロソリン酸は U2OS 細胞の概日リズム位相を前進あるいは後退させ、その向き・ずれの大きさは添加のタイミングや濃度によって異なっていた。また、Per2::Luc ノックインマウスの培養組織片においてもインスリンに感受性のある肝臓や脂肪においてコロソリン酸添加により発光リズムが後退した。このことからコロソリン酸はインスリン受容体を介した、インスリンと類似の時計遺伝子発現調節機能を有している可能性が考えられた。現在インスリンシグナルの阻害剤を用いて作用部位の特定、およびコロソリン酸によるインスリン受容体のリン酸化と Per2 リズムの関係について精査している。

corosolic acid, circadian clock, insulin signaling

発表責任者：大池　秀明（oike@affrc.go.jp）

講演番号：3A08a01
講演日時：3 月 19 日 09:20～ A 校舎 08 会場

# 脂肪酸添加加熱による難消化性処理澱粉の分子構造変化

# Changes in X-Ray Diffractometer of Resistant Rice powder

○大木 梓織[1]、中嶋 奎太[2]、森 大輝[2]、豊嶋 瑠美子[2]、石川 匡子[1,2]、秋山 美展[1,2] ([1]秋田県大生物資源、[2]秋田県大院生物資源)
○Shiori OKI[1], Keita NAKASHIMA[2], Daiki MORI[2], Rumiko TOYOSHIMA[2], Kyoko ISHIKAWA[1,2], Yoshinobu AKIYAMA[1,2] ([1]Akita Prefectural Univ., [2]Grad. Sch. Akita Prefectural Univ.)

【目的】新規難消化性澱粉の創製を目的として研究を行っている．これまでの実験結果から，馬鈴薯澱粉や米粉に脂肪酸を添加し一定温度で加熱することにより澱粉に難消化性を付与できることを確認している．これは，澱粉分子構造内で澱粉と脂肪酸とが複合体を形成するためと考えられているが，詳細なメカニズムは解明されていない．本研究ではこれらを明らかにするための一助として，脂肪酸添加加熱に伴う澱粉の分子構造変化を X 線回折装置によって解析した．

【方法】H27 年度製あきたこまち無洗米を使用した．試料米を小型ミルで粉砕後，75 ~ 250 μm に粉砕・篩別し，米粉試料とした．米粉の水分を 14, 20, 25%に調製し，脂肪酸（パルミチン酸、オレイン酸）を 0, 3, 5, 7%(w/w)添加混合後，ステンレス製密封容器に入れ，オイルバスで 140℃まで加熱し，ただちに氷冷し試料とした．次に，X 線回折装置（理学電機株式会社製 UltraX18）を用い，作製した試料の X 線回折図を得た．X 線源 Cu-Kα，管電圧 50 kV，管電流 27 mA，走査速度 1.20°/ 分，測定間隔 0.020°，走査角度 2θ = 5.0 ~ 40.0°の条件で測定した．得られた X 線回折データにより，脂肪酸や水分含量のちがいによる X 線回折図の変化を比較・分析した．

【結果】Fig 1. に無添加およびオレイン酸 7%添加試料（水分 14, 20, 25%）の X 線回折図を示す．水分含量の増加により，2θ = 12.0 ~13.5°，19.0 ~ 20.5°に新たなピークが確認された．これは，脂肪酸と澱粉が複合体を形成したために生じた分子構造の変化を反映しているものと推察される．また，これらのピークは水分含量に伴い増大したことから，水分含量の増加に伴い脂肪酸と澱粉とが結合しやすくなったことが示唆された．一方，無添加試料では米澱粉に特徴的な 2 つのピーク (2θ = 16.0 ~17.4°，17.4 ~ 19.0°）が観察されるが，水分含量の増加に伴いこれらのピークは減少した．

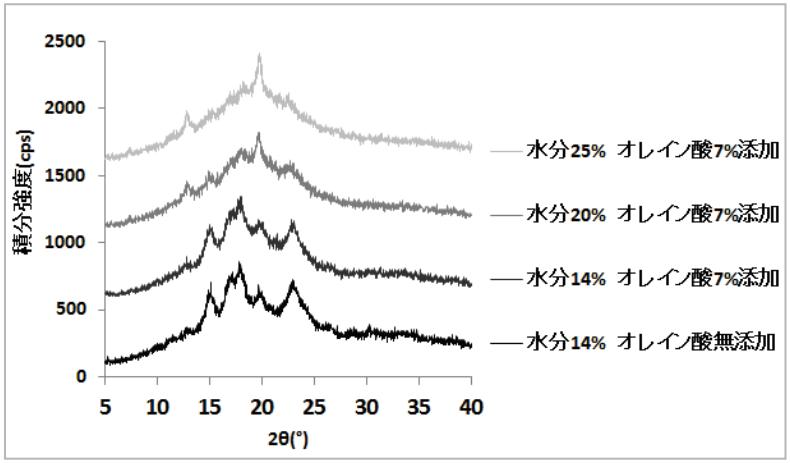



**Fig 1.　オレイン酸 無添加, 7%添加試料 X 線回折図**

resistant starch, fatty acid, X-ray diffraction (XRD)

講演番号：3A08a02
講演日時：3 月 19 日 09:35～ A 校舎 08 会場

# Study on functional food factors that hamper bile acid transport into liver

○Tzuwen HONG, Tsutomu HASHIDUME, Takashi SASAKI, Makoto SHIMIZU, Jun INOUE, Ryuichiro SATO (The Univ. of Tokyo)

Bile acids (BA) are the fundamental constituents in the bile. Their biosynthesis occurs in the liver as a result of cholesterol catabolism. In the ileum, BA are transported into the enterocyte by the ileal bile acid transporter (IBAT; SLC10A2) and then are exported into portal vein. In liver, BA are re-taken up by the Na+ tauocholate cotransporting polypeptide (NTCP; SLC10A1). The crucial roles of bile acids as emulsifiers to facilitate lipids digestion has long been recognized. More recently, bile acids also have been identified as signaling compounds for several nuclear receptors and membrane G protein coupled receptor like TGR5, and consequently regulates not only BA metabolism but also energy homeostasis and glucose metabolism. Accordingly, BA and their transporters have been studied widely as therapeutic targets, and several approaches to increased BA concentration in circulation have been reported with benefits on improving metabolic syndromes. However, the synthetic compounds administration sometimes with the risk of dislikable side effects. Thus, the alternative treatment with less or no complications is still in demand. Herein, in this study, we aimed to screen the potential food factors that hamper human NTCP and investigate their underlying mechanisms. We found out the food factor X among 156 kinds of food compounds in library, which decreases BA transport into hepatocyte using stable HepG2 cells expressed flag-tagged hNTCP. We here propose that moderately inhibition of NTCP mediated bile acid reuptake by food factors could enlarge the BA pool size and improve lipid and glucose homeostasis, which therefore provide a potentially therapeutic targets in prevention and treatment of metabolic syndromes.

Bile acid, NTCP, energy expenditure

発表責任者：洪子雯（tzuwen719@gmail.com）

講演番号：3A08a03
講演日時：3 月 19 日 09:50～ A 校舎 08 会場

# 低炭水化物食摂取下の肥満マウス肝臓に見られる脂質代謝関連遺伝子の発現変化

# A very low carbohydrate ketogenic diet alters expression of lipid metabolism-related genes in ob/ob mouse liver

○奥田 徹哉（産総研 生物プロセス）
○Tetsuya OKUDA (BPRI, AIST)

【研究の背景】 齧歯類用の低炭水化物・高脂肪食（F3666 飼料）を肥満（*ob/ob*）マウスに摂取させると、ケトン体の産生、高血糖及び高インスリン血症の改善など様々な効果が見られる。我々は 5-12 週齢の *ob/ob* マウスに F3666 を持続的に摂取させると、この時期に進行する脂肪肝の形成が抑制されることを新たに見出した[1]。詳細な解析により肝臓の lipogenic enzymes の発現が低下していることを見出し、糖質からのトリグリセリド合成が抑制されていることがわかったが、F3666 は野生型マウスにおいても lipogenesis を抑制するものの、脂肪肝の抑制効果は見られないため[2-3]、F3666 の他の作用も *ob/ob* マウスの脂肪肝形成の抑制に寄与していることが示唆された。そこで本研究では、網羅的遺伝子発現解析により F3666 の未知の効能にアプローチした。

【方法】 5-12 週齢の時期に F3666 を持続的に摂取させた *ob/ob* マウスの肝臓より mRNA を調製し、Agilent Expression Array による遺伝子発現解析を実施した。発現量の変化が検出された遺伝子は Real-time PCR により検証し、有意に変化する遺伝子を同定した。同定した遺伝子の産物は各種生化学分析法にて解析した。

【結果と考察】 通常食摂取群と比較して、F3666 摂取群では予想通り lipogenic enzyme genes の遺伝子発現の低下が見られた。加えて、新たに脂質代謝に関連する数種の遺伝子の発現変化を見出した。そのうち、酸性糖脂質の分解に必要な GM2 ganglioside activator (GM2A)は、F3666 の摂取群では遺伝子転写量が有意に減少しており、これに伴い産物である酸性糖脂質の含有量も増加していた。最近、前脳の酸性糖脂質を欠失させたマウスが肥満の表現型を呈し、その脂肪細胞では絶食誘導 lipolysis の制御が障害されているとの報告があり[4-5]、本研究にて見出した F3666 摂取による酸性糖脂質の増加も肝臓における lipolysis の制御に寄与している可能性がある。

Reference

[1] Okuda, T., *et al.* (2012) *Nutr. Diabetes* **2**, e50
[2] Kennedy, A. R., *et al.* (2007) *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **292**, E1724-E1739
[3] Okuda, T., *et al.* (2016) *J. Funct. Foods* **21**, 70-74
[4] Nordström, V., *et al.* (2013) *PLoS Biol.* **11**, e1001506
[5] Herzer, S., *et al.* (2015) *Diabetes* **64**, 3363-3376

low carbohydrate diet, fatty liver, glycolipid

発表責任者：奥田徹哉（t-okuda@aist.go.jp）

講演番号：3A08a04
講演日時：3 月 19 日 10:05～ A 校舎 08 会場

# 胎児期低タンパク質食暴露が成長後仔マウスの耐糖能・脂質代謝異常を誘導する

# Maternal protein restriction induces disorders of glucose tolerance and lipid metabolism in mouse offspring

○三好 萌[1]、大谷 りら[2]、斉藤 憲司[2]、賈 慧娟[2]、加藤 久典[2]([1]東大院・農生科・応用生化、[2]東大・総括)
○Moe Miyoshi[1], Lila Otani[2], Kenji Saito[2], Huijuan Jia[2], Hisanori Kato[2] ([1]Tokyo Univ., [2]Food for Life.)

【背景・目的】胎児期の栄養環境はエピジェネティックな遺伝子発現の変化をもたらし、肥満症や糖尿病等の生活習慣病発症に生涯にわたり影響する。本研究では、妊娠中に低タンパク質食を摂取した母から生まれたマウスに、出生後は通常食または高脂肪食を給餌し、食環境の変化により耐糖能・脂質代謝に及ぼす影響およびその作用メカニズムを検討することを目的とした。
【方法】C57BL/6J マウスを用いて、妊娠中に低タンパク質食（9%カゼイン）を給餌した母から生まれた雄仔マウスを母タンパク質制限群（LP)、通常食（20%カゼイン）を給餌した母から生まれた雄仔マウスを対照群（CN）とした。出生後は各群とも市販飼料と水道水で飼育し、6 週齢時に高脂肪食（45kcal%脂肪含有量）を与える群（CN-HF、LP-HF)、コントロール食（10kcal%脂肪含有量）を与える群（CN-C、LP-C）の 4 群へと群分けした。その後、16 週齢時に 16 時間絶食後経口糖負荷試験を行い、18 週齢時に解剖を行った。解剖時に回収した血漿を用いて生化学検査を行った。また、肝臓中脂質の測定および DNA マイクロアレイ（Mouse Genome 430 2.0 Array, Affymetrix）を用いての肝臓における網羅的な遺伝子発現変化についても解析した。
【結果】経口糖負荷試験では、CN-C 群と比較して 60 分後の LP-C 群の血糖値が増加傾向を示し、90 分後と 120 分後には有意な増加を示した。また、CN-HF 群と比較して 120 分後の LP-HF 群の血糖値も有意な増加を示した。終体重と白色脂肪重量は、CN-C 群と比較して LP-C 群と CN-HF 群で有意に増加した。生化学検査では、血漿中総コレステロール値が CN-C 群と比較して LP-C 群と CN-HF 群で有意に増加した。血漿中グルコース値は、CN-C 群と比較して LP-C 群で増加傾向を示した。肝臓中脂質の測定では、4 群間に差は見られなかった。さらに、肝臓を用いた DNA マイクロアレイ解析では CN-C 群と LP-C 群に着目したところ、発現増加が見られた経路として p53 signaling pathway や PPAR signaling pathway、発現減少が見られた経路として insulin signaling pathway が抽出された。
【考察】以上の結果より、胎児期に低タンパク質食暴露させた仔マウスに、通常食または高脂肪食を給餌すると耐糖能の異常を示した。さらに、通常食では肥満になるリスクが高まり、その機序に肝臓中の糖・脂質代謝関連遺伝子の変化が影響している可能性が示唆された。

DOHaD, maternal low protein restriction, DNA microarray

講演番号：3A08a05
講演日時：3 月 19 日 10:20～ A 校舎 08 会場

# 高脂肪食摂取マウスの白色脂肪組織においてグルココルチコイドによって誘導されたリポ多糖結合タンパクが炎症に寄与する

# Lipopolysaccharide-binding protein induced by glucocorticoid in the WAT of HFD-fed mice contributes inflammation

○関 真実[1]、苫米地 由香[1]、斉藤 伸一[2]、園山 慶[2]([1]北大院・生命、[2]北大院・農)
○Manami SEKI[1], Yuka TOMABECHI[1], Shinichi SAITO[2], Kei SONOYAMA[2] ([1]Hokkaido Univ. Grad. Sch. Life Sci., [2]Hokkaido Univ. Grad. Sch. Agric.)

【目的】リポ多糖結合タンパク（LBP）は主に肝臓で産生される急性期タンパクで、リポ多糖（LPS）に対する自然免疫応答を仲介する。我々はこれまでに、マウスに高脂肪食（HFD）を摂取させると、LBP の遺伝子発現が肝臓では変化せず、白色脂肪組織（WAT）で増加し、炎症性ケモカイン MCP1 の遺伝子発現と相関すること、またそれらの変化はわずか 3 日間の HFD 摂取でもみられることを報告した（関ら 2016 農化)。これらのことは､HFD 摂取が惹起する WAT 炎症に LBP が関与することを示唆する。また、LBP の発現は LPS によって誘導されるので、肥満にともなって腸内細菌由来の LPS の取り込みが増加する結果として生じる代謝性エンドトキシン血症の指標として、血中 LBP が測定される場合がある。しかしながら、我々は、HFD 摂取によって WAT における LBP の発現が増加しているマウスでも血中 LPS の上昇がみられなかったことや、無菌マウスにおいても HFD 摂取で WAT での LBP の発現増加がみられたことから、HFD 摂取による WAT での LBP の増加には LPS でなく別の因子が寄与していると推察した（関ら 2016 食品免疫学会)。LBP の遺伝子発現を誘導する因子としては LPS 以外にもグルココルチコイド（GC）が知られている。そこで、本研究では HFD 摂取による WAT での LBP の発現増加に GC が関与するか調べた。【方法】雄性 C57BL/6J マウスに通常脂肪食(NFD､D12450B)または HFD(D12492)を 3 日または 14 週間与えた後、麻酔下で全採血を行い、腸間膜脂肪組織（mWAT）を採取した。mWAT から total RNA を分離し、RT-qPCR により LBP mRNA レベルを推定した。また、血中コルチコステロン（CS）濃度を ELISA により定量した。さらに、マウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 を脂肪細胞へ分化誘導し、CS 添加が LBP 遺伝子発現におよぼす影響を RT-qPCR により解析した。また、GC 受容体アンタゴニストであるミフェプリストン（MIF）の同時添加の影響も調べた。【結果】mWAT における LBP mRNA レベルは 3 日間、14 週間の HFD 摂取でともに増加した。また、血中 CS 濃度は 3 日間の HFD 摂取により有意に減少したが、14 週間では有意に増加した。WAT LBP の発現レベルと血中 CS 濃度の間には 3 日間では負の相関（$r$＝0.62）がみられたが、14 週間では正の相関（$r$＝0.62）がみられた。一方、脂肪細胞に分化した 3T3-L1 細胞では 24 時間の CS(100 および 1000 ng/mL)添加により LBP mRNA レベルが増加する傾向がみられた。また、その増加は MIF (1 μM) の同時添加により抑えられる傾向がみられた。以上のことから､GC は HFD 摂取により誘導される WAT での LBP の発現増加に早期からは寄与しないものの、長期的には寄与している可能性が示唆された。現在、*in vivo* において GC が HFD 摂取による WAT での LBP の発現増加に寄与しているか否か検証するために、HFD 摂取マウスへの MIF 投与実験を行っている。

lipopolysaccharide-binding protein, obesity, glucocorticoid

講演番号：3A08a06
講演日時：3 月 19 日 10:45～ A 校舎 08 会場

レスベラトロールの食後高脂血症改善作用の解析
Effects of Resveratrol on Postprandial Hyperlipemia
○佐藤 綾[1]、高橋 真美[1]、勝間田 理恵[2]、井上 博文[2]、室田 佳恵子[3]、河田 照雄[4]、上原 万里子[2]、高橋 信之[2] ([1]東京農業大学大学院農学研究科食品栄養学専攻、[2]東京農業大学応用生物科学部食品安全健康学科、[3]近畿大学理工学部生命科学科、[4]京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻)
○Ryo SATO[1], Mami TAKAHASHI[1], Rie KATSUMATA[2], Hirobumi INOUE[2], Kaeko MUROTA[3], Teruo KAWADA[4], Mariko UEHARA[2], Nobuyuki TAKAHASHI[2] ([1]Tokyo University of Agriculture , graduate school., [2]Tokyo University of Agriculture., [3]Kinki University., [4]Kyoto University.)

【背景】近年、動脈硬化性疾患のリスクファクターとして、空腹時よりも食後における高脂血症が重要であると指摘されている。食後高脂血症は、小腸上皮細胞の核内受容体 PPARα の活性化を介した脂肪酸酸化亢進により、予防改善されることが報告されている。PPARα は様々な食品因子によって活性化され、赤ワインに含まれるポリフェノールであるレスベラトロールもその一つである。レスベラトロールは多様な生理機能を持つが、食後高脂血症に有効かどうかの報告はされていない。そこで本研究は、レスベラトロールが食後高脂血症に与える影響について検討した。
【方法】まず細胞レベルの影響を検討するため、Caco-2 細胞を 24-well プレートに播種し、2 週間培養後、レスベラトロールを 24 時間添加し、PPARα 標的遺伝子である *carnitine palmitoyl transferase-1a* (*CPT1a*)、*acyl-CoA synthase* (*ACS*)、*acyl-CoA oxidase* (*AOX*)の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法で解析した。レスベラトロールの遺伝子発現に対する作用が PPARα を介しているかどうかを明らかにするため、PPARα、γ、δ に対する阻害剤の効果を検討した。続いて、動物レベルの影響を検討するため、5 週齢雄性 C57BL/6 マウスを 1 週間の予備飼育後、高脂肪食群 (HFD、60 cal%fat) をコントロールとし、それに対して 0.02%、0.04%レスベラトロール投与群の 2 群を加えて、1 週間飼育した。この条件下で経口脂肪負荷試験 (OLTT) と腸管上皮組織での遺伝子発現解析を行った。
【結果・考察】Caco-2 細胞において、レスベラトロール添加により PPARα 標的遺伝子の mRNA 発現量が有意に増大し、この増大は PPARα 阻害剤添加によって消失した。OLTT では、高脂肪食群に対してレスベラトロール投与群において血中中性脂肪濃度が有意に低下した。腸管上皮組織における PAPRα 標的遺伝子の発現についても、レスベラトロール投与群で有意に増大した。これらレスベラトロールの作用は、PPARα ノックアウトマウスを用いた検討では認められなかった。以上の結果より、レスベラトロールには食後高脂血症改善作用があり、その作用は PPARα を介したものであることが示唆された。

PPARα, Postprandial hyperlipidemia, Resveratrol

発表責任者：高橋信之（nt204885@nodai.ac.jp）

講演番号：3A08a07
講演日時：3 月 19 日 11:00～ A 校舎 08 会場

ヒメウコギ *Eleutherococcus sieboldianus* 中の抗糖尿病性フラボノイドと抗肥満性テルペノイド
An anti-diabetic flavonoid and an anti-obesity triterpene analogue from leaves of *Eleutherococcus sieboldianus* (Makino) Koidz. 'Himeukogi'
○仁科 淳良[1]、板垣 匡哉[1]、鈴木 孝[2]、早川 智[3]、纐纈 守[4] ([1]日大理工、[2]日大薬、[3]日大医、[4]岐阜大工)
○ Atsuyoshi NISHINA[1], Masaya Itagaki[1], Takashi Suzuki[2], Satoshi Hayakawa[3], Momoru Kouketsu[4] ([1]Nihon Univ. CST, [2]Nihon Univ. CPC, [3]Nihon Univ. Med., [4]Gifu Univ.)

【目的】
ヒメウコギ *Eleutherococcus sieboldianus* (Makino) Koidz.は中国原産で日本の山形県米沢市近郊の特産物の一つである。中世から生垣として利用されるとともに食用とされ、長い食経験を有する。これまで、同植物の粗抽出物を用いた動物実験の結果に基づく抗糖尿作用の報告があるが、有効成分は明らかになっていない。本研究では 3T3L1 細胞がインスリンによって脂肪細胞分化する際に細胞内に蓄積される脂質量に対する被験サンプル効果を比較する方法を用いて、*E. sieboldianus* 中の抗糖尿病または抗肥満物質の探索を試みた。
【方法】
山形県米沢市内で購入し、乾燥した *E. sieboldianus* からヘキサン抽出物、クロロホルム抽出物、メタノール抽出物を調製した。顕著な活性が認められたメタノール抽出物から各種クロマトグラフィーを用いて含有成分を単離した。活性成分の作用機構を推定するために細胞内の C/EBPα、FABP4、PPARγ、ACC、FAS、Perilipin、Adiponectin、GLUT4 の発現量に対する各成分の作用を比較した。
【結果】
*E. sieboldianus* から調製したヘキサン抽出物、クロロホルム抽出物、メタノール抽出物の細胞毒性は微弱であった。3 種の抽出物のうちメタノール抽出物は、脂肪細胞分化による細胞内脂質の蓄積を有意に抑制した。次に、メタノール抽出物から各種クロマトグラフィーをもちいて、4 種のフラボノイド配糖体（物質１－４）と 4 種のトリテルペンまたはトリテルペン配糖体（物質５－８）を単離・同定した。単離化合物のうち化合物 2 と 8 はそれぞれ 30μM の濃度で脂肪細胞分化による細胞内脂質蓄積を促進または抑制した。すなわち、*E. sieboldianus* メタノール抽出物には脂肪細胞分化による細胞内脂質蓄積を促進または抑制する両方の成分が含まれていることが分かった。
化合物 2 は陽性対照として用いたチアゾリジン系抗糖尿病薬（TZD）と同様に脂肪細胞を小型化した。一方、化合物 2 は TZD と異なり 10μM で PPARγ の発現量を増やすとともに脂肪細胞の小型化を促進したことから化合物 2 の作用機構は TZD と異なる可能性がある。化合物 8 は 3 種の脂肪細胞分化関連タンパク質（C/EBPα、FABP4、PPARγ）と GLUT4 の発現を抑えることにより脂肪細胞分化とグルコースの細胞への取り込みを抑制し、結果として細胞内脂質の蓄積を抑制すると考えた。

Eleutherococcus sieboldianus (Makino) Koidz., Adipogenesis, Glucose transporter type 4

発表責任者：仁科淳良（nishina.atsuyoshi@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3A08a08
講演日時：3 月 19 日 11:15～ A 校舎 08 会場

チョウザメ由来コラーゲンペプチドは体内で糖代謝促進作用を示す
Collagen Peptide Prepared from Sturgeon Shows Hypoglycemic Effect in the Blood
○笹岡 友季穂、岸村 栄毅（北大水）
○Yukiho SASAOKA, Hideki KISHIMURA (Hokkaido Univ.)

【目的】先に我々は、コラーゲンを豊富に含むチョウザメの未利用部位からコラーゲンペプチドを調製し、マウス及びラットを用いた糖負荷試験において血糖上昇抑制作用を示すことを明らかにした。その作用機序として、チョウザメ由来コラーゲンペプチド（SCP）は小腸でのグルコースの吸収を抑制し、吸収抑制を受けたグルコースが糞中へ排泄されることが示唆された。しかし、投与された大部分のグルコースは体内に吸収されていることから、血中のグルコースを速やかに代謝させる機序も存在すると考えた。そこで本研究では、動物体内での SCP の糖代謝促進作用を検討するため、SCP とグルコースを異なる経路から投与し、血糖変化を測定した。
【方法】ベステル・チョウザメ(*Huso huso* × *Acipenser ruthenus*)の未利用部位（皮、骨、鰭）を 50 ℃でパパイン消化後、その遠心上清を凍結乾燥した。この乾燥粉末をエタノールで脱脂し、これを SCP とした。(1)SCP 経口投与－グルコース腹腔内投与試験では、ICR マウスに 1.5 g/kg 体重の SCP を経口投与した後、0、15 及び 30 分後に 2.0 g/kg 体重のグルコースを腹腔内投与し、それぞれ血糖値の経時変化を測定した。(2)ラット腸管ループを用いた糖負荷試験では、麻酔下の SD ラットの小腸を結紮して腸管ループを作製し、3.0 g/kg 体重の SCP を腸管ループ内に注入した。SCP 注入から 30 分後、2.0 g/kg 体重のグルコースを腹腔内に滴下し、血糖値変化を測定した。(3)SCP 静脈内投与－グルコース腹腔内投与試験では、ICR マウス及び SD ラットに 1.5 g/kg 体重の SCP を静脈内投与後、速やかに 2.0 g/kg 体重のグルコースを腹腔内投与し、血糖値変化を測定した。(4)SCP 静脈内投与試験では、ICR マウスに 1.5g/kg 体重の SCP を静脈内投与し、血糖値変化を測定した。
【結果】 (1)マウスを用いた SCP 経口投与－グルコース腹腔内投与試験において、SCP 投与から 0 及び 15 分後にグルコース投与した場合、試験群では対照群に対して血糖値が有意に低下した。しかし、30 分後にグルコース投与した場合には、両群に差は認められなかった。(2)ラット腸管ループを用いた糖負荷試験において、試験群で血糖値が低下する傾向が認められた。また、(3)消化管を介さず、マウス及びラットに SCP を静脈内投与し、グルコースを腹腔内投与したところ、マウスを用いた試験において、試験群の血糖値が極めて有意に低下した。さらに、(4)マウスに SCP のみを静脈内投与したところ、試験群の血糖値の著しい低下は認められなかった。以上の結果から、小腸から体内に吸収された SCP が、血糖依存的に体内で糖代謝促進作用を示すことが示唆された。その作用機序を検討するため、現在、SCP を投与した際の血中の GLP-1 濃度、インスリン濃度等の測定を行っている。

sturgeon, collagen peptide, hypoglycemic effect

発表責任者：岸村　栄毅（kishi@fish.hokudai.ac.jp）

講演番号：3A08a09
講演日時：3 月 19 日 11:30～ A 校舎 08 会場

# ラットにおけるピセアタンノールの血糖値上昇抑制作用

# Enhanced glucose tolerance by piceatannol in freely moving healthy rats

○織谷 幸太[1]、興津 輝[2]、西村 栄作[1]、齋 政彦[1]、竹内 昌治[2] ([1]森永製菓(株)、[2]東大生産研)
○Yukihiro ORITANI[1], Teru OKITSU[2], Eisaku NISHIMURA[1], Masahiko SAI[1], Shoji TAKEUCHI[2]
([1]Morinaga & Co., Ltd., [2]Institute of Industrial Science, The University of Tokyo)

【目的・背景】パッションフルーツの種子に含有されるピセアタンノールは、スチルベン骨格を持つポリフェノールである。近年、マウスにおいてピセアタンノールの経口摂取が血糖値の上昇抑制作用を示すことが報告されていた。しかし、消化管からの吸収後に未変化体のピセアタンノールとその代謝産物のいずれが血糖値の上昇抑制作用に寄与しているのかは明らかになっていなかった。そこで本研究ではピセアタンノールの血糖値上昇抑制作用に対する代謝産物の寄与とその作用機序を明らかにすることを目的に実験を行った。
【方法】ピセアタンノールあるいはその代謝産物であるイソラポンチゲニンが耐糖能に与える影響を評価するために､頸静脈及び頸動脈にカテーテルを留置したフリームービングな SD ラットを作製し、それら化合物を血管内投与した後に糖負荷試験を行った。さらに、血管内投与されたピセアタンノールがインスリン感受性に与える影響を評価するために hyperinsulinemic-euglycemic clamp を行った。
【結果】糖負荷試験の結果、ピセアタンノールを投与した群では、血糖値の曲線下面積がコントロールと比較して低下していた。一方、この作用はイソラポンチゲニンには認められなかった。この結果からピセアタンノールの経口投与による血糖上昇抑制作用は、未変化体で吸収されたピセアタンノールによる作用であることが示唆された。つぎに、 hyperinsulinemic-euglycemic clamp の結果、インスリン感受性にピセアタンノールの投与は影響を与えないことがわかった。しかし、糖負荷試験の際に、ピセアタンノールの投与によりインスリン分泌は初期に上昇していることが確認された。これらの結果から、正常ラットにおけるピセアタンノールの血糖値上昇抑制の作用機序には、インスリンの分泌促進作用が重要であると考えられた。

piceatannol, glucose tolerance, freely moving rat

講演番号：3A08a10
講演日時：3 月 19 日 11:45～ A 校舎 08 会場

咀嚼機能を向上させるグミゼリーの特徴
Characterization of gummy jelly for masticatory training
○小野寺 雅彦[1]、藤原 茂弘[2]、鈴木 潔[1]、堀 一浩[2]、小野 高裕[2] ([1]ユーハ味覚糖（株）、[2]新潟大院・医歯学)
○Masahiko ONODERA[1], Shigehiro FUJIWARA[2], Kiyoshi SUZUKI[1], Kazuhiro HORI[2], Takahiro ONO[2] ([1]UHA Mikakuto Co., [2]Grad. Sch. Med. and Dent. Sci., Niigata Univ.)

【目的】近年、咀嚼能力の低下と生活習慣病やメタボリックシンドロームとの間に関係があることが示されるなど、口腔機能と全身の健康との関係への注目が高まりつつある。また、現代の食生活は、柔らかい食べ物の摂取が増えたことから、咀嚼回数の減少、咀嚼能力の低下が懸念されている。咀嚼能力を決定する因子としては、歯数、噛み合わせ、義歯の調子、筋力（咬合力）、唾液分泌、口腔感覚、集中力などが挙げられる。これらの中で咬合力は意識的に鍛えることが可能であると考えられる。
本研究では、グミゼリー（以下、グミ）を使用したトレーニングにより咬合力を鍛えることを目的とし、トレーニング用のグミの特徴に関する知見を報告する。
【方法】試作したトレーニンググミ（TG）および一般に市販されているグミの硬さをテクスチャーアナライザー（TA.XT plus、Stable Micro Systems 社）による突き刺し試験によって評価した。次に、嚥下に至るまでの咀嚼回数、咀嚼終了後の疲労度を評価した。疲労度は視覚的アナログ尺度（Visual Analogue Scale（VAS））法によって評価した。さらに、TG に関しては咬筋部表面筋電図による疲労度も評価した。筋電図での評価は咀嚼終了後に 7 秒間の噛み締めを指示し、安定した 1 秒間の周波数成分の解析を行った。
【結果・考察】突き刺し試験の結果、TG の硬さは 42.3±1.9 N であった。一般に市販されているいわゆるソフト食感グミ（SG）の値は 8.9±0.5 N およびハード食感グミ（HG）は 15.6±0.5 N であり、TG の方がそれぞれ 4.7 および 2.7 倍と硬かった。また、嚥下までに必要な咀嚼回数は、SG より 1.9～3.6 倍ないし、HG より 1.3～2.9 倍と多かった。VAS 法による疲労度の評価でも、上記 3 つのグミの中で TG により高い傾向を認めた。また、TG 咀嚼後は咀嚼前と比較し、周波数成分が低域にシフトし、筋疲労の徴候を認めた。さらに、TG より硬いグミを作製し（硬さ：71.0±2.9 N）、咀嚼中の咬筋の動きを筋電図で計測したところ、TG 咀嚼時より咬筋活動量の減少が観察された。これは、グミが硬すぎることで上手く噛むことができず、咬筋へ効率的に負荷が加わらなかったことが原因と考えられた。
これらの結果から、本トレーニンググミは咬筋へトレーニング負荷をかけるのに適度な硬さがあり、咬合力を鍛えるのに適した食品であることが示唆された。
今後さらに、当該グミを用いて長期間の継続した咀嚼トレーニングを行い、解析を行う予定である。

gummy jelly, characterization, masticatory training

発表責任者：小野寺雅彦（onoderam@uha-mikakuto.co.jp）

講演番号：3A08p01
講演日時：3 月 19 日 14:00～ A 校舎 08 会場

# Flavan 3-ols 投与によって誘導されるストレス応答反応の検証

Verification of stress response induced by administration of flavan 3-ols

○藤井 靖之、川越 藍、志籐 隼祐、越阪部 奈緒美（芝浦工業大学）
○ Yasuyuki Fujii, Ai Kawagoe, Shunsuke Shito, Naomi Osakabe (Shibaura Institute of Technology)

ポリフェノールの一種である Flavan 3-ols の摂取することによって、メタボリックシンドロームのリスクファクターが改善されることが明らかとなっている。一方、 Flavan 3-ols の生体利用性は極めて低いことから、その作用メカニズムは未だ不明である。我々はこれまでに Flavan 3-ols の循環刺激やエネルギー代謝といった作用が、交感神経を介して発現することを見出している[1,2]。生体にストレスがかかった場合、交感神経が刺激される反応である SAM 系（Sympatho-adrenal medullar）が、またストレスホルモンが分泌される反応である HPA 系（hypotharamus -pituitary-adrenal）が活性化することが知られている。そこで本研究では、Flavan 3-ols の有益な作用がストレス応答反応に基づくことを明らかにすることを目的に HPA 系の反応を観察することとした。

実験には 8 週令 ICR 系雄性マウスを用い、精製水または Flavan 3-ols 10mg/kg を経口投与した 2 及び 4 時間後に断頭にて採血を実施した。また同様な処置をした動物をペントバルビタール麻酔下において開胸し、左心室から 4%PFA 25ml で還流固定を実施した。採取した全脳は脱水後、xylene で透徹、パラフィンで包埋しブロックを作成した。サンプルは bregma から-3ｍｍ付近から連続切片を作成した。切片作成後、視床下部室傍核における神経活動マーカーである cfos および副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン（CRH）の発現を蛍光免疫染色法で検出した。また血漿中のコルチコステロン濃度を ELISA 法を用いて測定した。

視床下部室傍核の CRH は Flavan 3-ols 10mg/kg 投与 4 時間後で有意に上昇することが分かった。また血漿コルチコステロン濃度も投与 4 時間後で精製水投与群と比較して有意な高値を示した。

以上のことから、Flavan 3-ols は生体においてストレスとして認識されることが明らかとなった。またこれまで得られた Flavan 3-ols の有益な生理作用はストレス応答反応の結果として発現することが示唆された。

1）Kamio et. al Free Rad Biol Med, 91:256-63, 2016
2）Saito et al. Free Rad Biol Med, 99:584-592,2016

flavan 3-ols, stress, CRH

講演番号：3A08p02
講演日時：3 月 19 日 14:15～ A 校舎 08 会場

ホップ由来ビール苦味成分イソα酸の肥満に伴う認知機能低下の改善効果
Iso-α-acids, bitter components of beer, improve obesity-induced cognitive decline
○綾部 達宏[1]、内田 真一[2]、山田 浩司[2]、阿野 泰久[1]([1]キリン（株）・健康研、[2]協和発酵キリン（株）・中枢研)
○Tatsuhiro AYABE[1], Shinichi UCHIDA[2], Koji YAMADA[2], Yasuhisa ANO[1] ([1]Kirin Co., Ltd., [2]Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd)

現在日本では高齢化や食生活等の変化に伴い、認知症患者数が約 460 万人、メタボリックシンドローム患者数が約 960 万人と増加し、いずれも大きな社会問題となっている。さらに近年、肥満やメタボリックシンドロームは認知症発症のリスクを高めることが多数報告されており、肥満と認知機能の関連は注目を集めている。これまでに我々は、ホップ由来のビール苦味成分であるイソα酸が、抗肥満効果およびメタボリックシンドローム改善効果を有することを動物およびヒトを用いた試験で明らかにしているが、イソ α 酸の抗肥満作用が認知機能へ及ぼす効果は不明である。そこで本研究では、高脂肪食負荷による肥満マウスを用いて、肥満による認知機能低下作用を検証し、イソα酸の抗肥満効果と認知機能改善効果の評価を行った。

5 週齢の雄性 C57BL/6J マウスに通常食、60%高脂肪食または 0.05%（w/w）イソα酸含有 60%高脂肪食を 8 週間混餌投与した。イソ α 酸含有高脂肪食群では投与 14 日目より高脂肪食群と比較して体重が有意に低下した。イソα酸含有高脂肪食群では脂肪重量及び血漿中のトリグリセリド、グルコース濃度などが高脂肪食群と比較して低下し、脂質、糖代謝異常が改善した。

続いて、認知機能の一部であるエピソード記憶を評価する Object recognition test（ORT）および空間記憶を評価する Object location test（OLT）により、試験食摂取 7 週目における認知機能を評価した。ORT の結果、高脂肪食群では通常食群と比較して新奇物体へのアプローチの割合が有意に低く、イソα酸含有高脂肪食群では高脂肪食群と比較して有意に高かった。OLT についても同様の傾向が確認でき、イソα酸は高脂肪食負荷による記憶学習機能の低下を改善することが明らかになった。

更に、各脳領域の重量について、高脂肪食群では海馬重量が通常食群と比較して有意に低下し、海馬の委縮が認められたが、イソα酸含有高脂肪食群ではその委縮が抑制された。また、各種サイトカイン量を Multiplex assay にて測定したところ、海馬における TNF-α をはじめとする炎症性サイトカイン・ケモカインが高脂肪食群では通常食群と比較して有意に増加するが、イソα酸含有高脂肪食群では高脂肪食群と比較して有意に低下した。

以上のように本研究では、高脂肪食負荷は脳内での炎症を惹起し、主として海馬委縮が生じる事で認知機能が低下することを明らかにした。更に、ビール苦味成分であるイソα酸は、高脂肪食負荷に対して抗肥満効果を示すと同時に、脳内炎症および認知機能低下を改善することを新規に見出した。本結果により、肥満に伴う認知機能の低下にはイソα酸が有効であることが示唆された。

iso-α-acids, obesity, cognitive function

発表責任者：綾部達宏（Tatsuhiro_Ayabe@kirin.co.jp）

講演番号：3A08p03
講演日時：3 月 19 日 14:30～ A 校舎 08 会場

db/db マウスにおける等カロリーの大豆油および魚油含有大豆油を含む低脂肪食と高脂肪食のエネルギー代謝および腹腔内脂肪に与える影響
Effects of isocaloric low fat and high fat diets containing soybean and fish oil supplemented soybean oil on energy metabolism and abdominal fat deposition in db/db mice
○池田 郁男[1]、池田 英介[1]、奥野 綾夏[1]、佐藤 歩実[1]、中村 珠子[1]、中野 卓[1]、井上 奈穂[2]([1]東北大院農、[2]山形大農)
○Ikuo Ikeda[1], Eisuke Ikeda[1], Ayaka Okuno[1], Ayumi Satoh[1], Tamako Nakamura[1], Suguru Nakano[1], Nao Inoue[2] ([1]Tohoku Univ. Grad. Sch. Agric. Sci., [2]Yamagata Univ. Fac. Agric.)

【目的】
等カロリー摂取条件下で、高脂肪食は低脂肪食よりも肥満すると考えられているがその機構は明確ではない。本試験では、食餌脂肪として大豆油および魚油添加大豆油を用い、7%添加の低脂肪食と21%添加の高脂肪食で肥満・Ⅱ型糖尿病モデルマウスである db/db マウスを等カロリーの pair-feeding で飼育し、腹腔内脂肪重量への影響と共に、脂質代謝およびエネルギー代謝に与える影響を調べた。
【方法】
試験には 5 週齢雄性 db/db マウスを用いた。試験食は AIN-93G に準じて大豆油および魚油添加大豆油を 7%添加した低脂肪高炭水化物食の 7S および 7F 群と、21%添加した高脂肪低炭水化物食の 21S および 21F 群とした。7S 食で予備飼育後 4 群に分け、pair-feeding で飼育した。摂食試験は 2 回行い、実験 1 では飼育 3 週目および 7 週目に生体ガス質量分析装置を用いてエネルギー代謝測定を行った。実験 2 では 9 週間飼育し、最終日に絶食せずに屠殺した。統計は二元配置分散分析を用いた。
【結果・考察】
実験 1：飼育 7 週目において、高脂肪食摂取群では低脂肪食摂取群に比べて、24 時間あたりのエネルギー消費量は高かった。
実験 2：pair-feeding 条件のため、総摂取カロリーは 4 群間でほぼ同等であったが、高脂肪食摂取群では低脂肪食摂取群より摂食効率、体重増加量および腹腔内脂肪重量は高かった。しかし、食餌脂肪の質の影響はみられなかった。肝臓トリアシルグリセロール濃度は低脂肪食摂取群または魚油添加大豆油食摂取群で有意に低かった。肝臓の脂肪酸生合成系酵素である脂肪酸合成酵素(FAS)の活性は高脂肪食摂取群で低い傾向にあり、ペルオキシソーム β 酸化酵素であるアシル CoA オキシダーゼ(ACO)やミトコンドリア β 酸化酵素であるカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ(CPT)活性はいずれも高脂肪食摂取群および魚油添加大豆油食摂取群で有意に高かった。糞中脂肪酸排泄量は高脂肪食摂取群で高かったものの、いずれの群も脂肪酸排泄率は 1%以下であった。
以上の結果、高脂肪食ではエネルギー消費量および糞便への脂肪酸排泄量が高いにもかかわらず、体重増加量や腹腔内脂肪重量が高かったことから、内臓脂肪が蓄積する機構は明らかにならなかった。また、内臓脂肪蓄積への魚油添加の影響は認められなかった。

energy metabolism, fish oil, abdominal fat

発表責任者：池田郁男（iikeda@biochem.tohoku.ac.jp）

講演番号：3A08p04
講演日時：3 月 19 日 14:45～ A 校舎 08 会場

フコースの肥満抑制効果
Anti-obese effects of fucose
○苑 暁[1]、大原 和幸[1]、佐藤根 妃奈[1]、伊東 美保[1]、小南 友里[1]、潮 秀樹[1]、相澤 光輝[2]、上野 友哉[2]、松田 秀喜[2] ([1]東大院農、[2]焼津水産化学)
○Xiao YUAN[1], Kazuyuki OHARA[1], Hina SATONE[1], Miho ITO[1], Yuri KOMINAMI[1], Hideki USHIO[1], Teruki AIZAWA[2], Tomoya UENO[2], Hideki MATSUDA[2] ([1]Tokyo Univ., [2]YSK)

内臓脂肪の蓄積やそれに伴う体重の増加は，哺乳類の代謝性疾患を誘引するリスクファクターの一つと考えられており，内臓脂肪量および体重の適切な管理が重要である．これらの管理には適切な食生活や定期的な運動などを採用するなど生活習慣の改善が有効であるが，現代社会では容易ではない．そのため，内臓脂肪量および体重の適切な管理を可能とする食品成分の開発が有効であるとされる．フコース（fucose，6-deoxygalactose）は，食経験のある褐藻のフコイダンなどの構成糖として認められるほか，糖タンパク質の N 結合糖鎖に含まれる．本研究では，フコースが高カロリー食を摂取したマウスに及ぼす影響について検討した．

c57BL/6JJc1 マウス（6 週齢，オス）31 個体を 5 群に分け，試験環境に馴致した．続いて、0.0001，0.001，0.01 および 0.1%フコース含有試験飼料あるいは対照飼料を 30 日間与え、経時的に体重を測定するとともに CT スキャンを用いてマウスの腹腔内脂肪重量および肝脂肪率を算出し，尾静脈より採血した. 非還元条件の SDS-PAGE/ウェスタンブロッティングによって検血液中に含まれるアディポネクチンを定量した．対照群とフコース投与群間で摂餌量に有意な差は認められず，両区で体重は漸増したが，対照群に比べて 0.01 および 0.1%フコース投与群で有意に体重増加が抑制された． 0.01 および 0.1%フコース投与群で 9 および 25 日目に有意な内蔵脂肪量の低下が認められたが，肝脂肪量には有意な差は認められなかった．

次いで，2mg/尾のフコースをマウスにゾンデにて経口投与して 24 時間後に肝臓を摘出し，全 RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行った．マウスゲノム配列上にマッピングし，発現量解析を行った．次いで，対照群とフコース投与群間で発現量に有意差が認められたトランスクリプトについて Gene ontology 解析を行った．その結果，upregulate された gene set として，negative regulation of insulin secretion involved in cellular response to glucose stimulus，negative regulation of gluconeogenesis，heat generation，cellular response to lipid，positive regulation of lipid metabolic process，negative regulation of lipid biosynthetic process，negative regulation of lipid storage，glucose homeostasis，aerobic respiration などが有意に上昇した． 一方，定量 PCR にて長鎖脂肪酸のトランスポーターとして機能する CD36 の発現量を比較したところ，肝臓では対照群に比べてフコース投与群で有意に CD36 の発現が低下した．以上のように，遺伝子発現レベルでも，フコースの投与によって脂質蓄積が抑制され，脂質の異化反応が促進されることが裏付けられた．

fucose, obesity, transcriptome

発表責任者：潮　秀樹（aushio@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A08p05
講演日時：3 月 19 日 15:00～ A 校舎 08 会場

# フコースが脂肪細胞分化・成熟に及ぼす影響

# Effect of fucose on adipocyte differentiation and maturation

○伊東 美保[1]、苑 暁[1]、大原 和幸[1]、佐藤根 妃奈[1]、小南 友里[1]、潮 秀樹[1]、相澤 光輝[2]、上野 友哉[2]、松田 秀喜[2] ([1]東大院農、[2]焼津水産化学工業 (株))
○Miho ITO[1], Xiao YUAN[1], Kazuyuki OHARA[1], Hina SATONE[1], Yuri KOMINAMI[1], Hideki USHIO[1], Teruki AIZAWA[2], Tomoya UENO[2], Hideki MATSUDA[2] ([1]Tokyo Univ., [2]YSK)

【背景】
肥満は代謝性疾患を引き起こすリスクファクターとして広く認知されているが、肥満状態にある人口は世界で増え続けている。そのため肥満の改善方法が求められており、食品成分の開発が積極的に行われている。フコースは、食物として摂取される褐藻に含まれるフコイダンの構成単糖として知られる。本研究では、フコースが脂肪細胞の分化・代謝に与える影響について検討した。
【方法】
まず、マウス由来の 3T3-L1 前駆脂肪細胞を分化試験に供した。DMEM で培養した 3T3-L1 をコンフルエント状態で分化培地 (5 μg/ml insulin, 0.5 mM isobutyl-methylxanthine, 1 μM dexamethasone 添加)に切り替え 7 日間培養し、その後 2 日間 DMEM で培養し、分化誘導を行った。この際、分化誘導日からそれぞれを、低グルコース区 (0.1% glucose)、低グルコース、フコース添加区 (0.1% glucose, 0.1% fucose)、高グルコース区 (0.45% glucose)、高グルコース、フコース添加区 (0.45% glucose, 0.1% fucose)に分け、培地にグルコース、フコースを加えた。分化培地に切り替えた日から起算して、３、６、９日目における脂肪細胞分化の指標となる preadipocyte factor-1 (pref-1)、CCAAT/enhancer binding protein beta (C/EBP beta)、peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma)の発現量を、定量 PCR を用いて測定した。
次に、分化後の 3T3-L1 に対してフコース投与を行った。試験区はそれぞれ低グルコース区 (0.1% glucose)、低グルコース、フコース添加区 (0.1% glucose, 0.1% fucose)、高グルコース区 (0.45% glucose)、高グルコース、フコース添加区 (0.45% glucose, 0.1% fucose)である。各試験培地にて 1 日培養したのち、全タンパク質を抽出し、定量型 NanoLC-MS/MS によってプロテオーム解析を行った。
【結果・考察】
低グルコース、フコース添加区では 9 日目サンプルにおいて、高グルコース、フコース添加区では 6 日目サンプルと 9 日目サンプルにおいて、フコース未投与区と比較して pref-1 の有意な上昇が観察された。また、C/EBP beta と PPAR gamma の発現は、フコース投与区において遅延されることが明らかとなった。これらのことから、フコースは脂肪細胞の分化・成熟を遅延させるものと考えられた。

fucose, adipocyte, differentiation

発表責任者：潮　秀樹（aushio@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A08p06
講演日時：3 月 19 日 15:25～ A 校舎 08 会場

表面加工玄米の継続摂取による脂質代謝改善効果の検討：リポタンパク質粒子サイズ解析に基づく血中脂質プロファイル
Effect of partially-abraded brown rice consumption on lipid metabolism improvement: lipoprotein profile

○荒木 理沙[1]、潮 玲子[2]、藤江 敬子[1]、植山 ゆかり[2]、鈴木 浩明[1]、中田 由夫[1]、橋本 幸一[1]([1]筑波大・医学医療系、[2]筑波大院・人間総合科学)
○Risa Araki[1], Reiko Ushio[2], Keiko Fujie[1], Yukari Ueyama[2], Hiroaki Suzuki[1], Yoshio Nakata[1], Koichi Hashimoto[1] ([1]Fac. Med., Tsukuba Univ., [2]Grad. Sch. CHS., Tsukuba Univ.)

【目的】玄米には様々な微量栄養素や機能性成分が含まれ、肥満や生活習慣病の予防における有効性が示唆されている。近年、国内外で玄米の健康効果が注目されている。しかし、白米に劣る食味や炊飯時間の長さから、玄米食の普及は進んでいない。この現状をふまえ、食品総合研究所の加工技術により、食味や吸水性を向上した表面加工玄米が新たに開発された。また、近年、小型の low-density lipoprotein（LDL）の増加と生活習慣病との関連が注目されている。そこで、本研究では、表面加工玄米の継続摂取による脂質代謝改善効果について、粒子サイズを含めた詳細な血中脂質プロファイルに着目した検討を行なうことを目的とした。

【方法】40～64 歳かつ body mass index 25 kg/m$^2$ 以上 30 kg/m$^2$ 未満の前糖尿病患者 42 名を無作為に 2 群に分け、検査食として表面加工玄米または白米（米飯 200 g×2 回/日）を 12 週間継続して摂取する食事介入試験を実施した。介入開始前と 12 週後に身体計測、早朝空腹時採血を行なった。血中脂質の質的変化の評価には、ゲルろ過 HPLC 法によるリポタンパク質解析受託サービス（LipoSEARCH）を用い、主要 4 分画および粒子サイズに基づくサブクラス 20 分画の中性脂肪（TG）濃度、コレステロール濃度と粒子数を測定した。介入開始前に同意を撤回した 1 名を除き、表面加工玄米群 21 名、白米群 20 名の計 41 名を解析対象とした。

【結果・考察】表面加工玄米群では、白米群に比べて 12 週間で腹囲が顕著に減少し（$p<0.01$）、内臓脂肪の減少が示唆された。介入前後における LDL、small LDL、very small LDL 中の TG 濃度の変化量は、表面加工玄米群ではそれぞれ－1.0 ± 5.8 mg/dL、－0.3 ± 1.4 mg/dL、－0.2 ± 0.2 mg/dL であり、白米群の 5.0 ± 5.2 mg/dL、1.4 ± 1.5 mg/dL、0.6 ± 0.9 mg/dL に比べて減少していた（いずれも $p<0.01$）。各分画中のコレステロール濃度の変化量にも同様の傾向がみられた（small LDL：$p = 0.068$、very small LDL：$p = 0.051$）。さらに、small LDL、very small LDL 粒子数も、白米群に比べて表面加工玄米群で減少していた（いずれも $p<0.05$）。これらの結果から、表面加工玄米は白米に比べて内臓脂肪や小型の LDL を減少させやすく、継続的な摂取が脂質代謝改善に有効となる可能性が期待された。

partially-abraded brown rice, lipid metabolism, lipoprotein profile

講演番号：3A08p07
講演日時：3 月 19 日 15:40～ A 校舎 08 会場

# SREBP 活性を抑制する食品成分の探索とその抑制機構の解析

Searching for dietary compound suppressing SREBP activity and its molecular mechanism

○岩瀬 将盛、宮田 慎吾、清水 誠、井上 順、佐藤 隆一郎（東大院農生科・応生化）
○Masamori IWASE, Shingo MIYATA, Makoto SHIMIZU, Jun INOUE, Ryuichiro SATO (The Univ. of Tokyo)

【目的】
Sterol regulatory element-binding protein(SREBP)は生体内の脂質代謝を包括的に制御する転写因子で、SREBP 活性の上昇は脂肪酸合成やコレステロール合成促進につながることが知られている。SREBP には 1a, 1c, 2 の 3 つの isoform が存在し、SREBP1c は主に脂肪酸合成、SREBP2 はコレステロール合成を亢進する。SREBP は小胞体膜上に前駆体として合成され、プロセシングを受けることで活性型となり、転写因子として機能する。SREBP 活性の抑制は食餌性肥満マウスや 2 型糖尿病マウスの体重増加や脂肪肝を抑制することが報告されており、生活習慣病改善のターゲットとして期待される。そこで我々は SREBP 活性を抑制する食品成分の探索を行い、その分子機構の解明を目的として研究を行った。
【方法】
食品成分の SREBP 活性抑制能を評価するために、SREBP1c の標的遺伝子として知られる脂肪酸合成酵素(FAS)遺伝子のプロモーター活性を簡便に測定できる評価系を構築した。Luciferase 遺伝子の上流に FAS 遺伝子プロモーター領域を挿入したプラスミドを安定に発現する細胞を、ヒト肝がん由来細胞 Huh7 細胞を用いて樹立し、その細胞に食品成分を処理した時の Luciferase 活性を調べることで、FAS 遺伝子のプロモーター活性を評価した。プロモーター活性の低下が見られた食品成分については、内因性 FAS 遺伝子発現や、活性型 SREBP タンパク質量におよぼす影響について検討を行った。
【結果】
検討を行った 287 種類の食品成分のうち、Allyl Isothiocyanate と Chrysin は FAS 遺伝子プロモーター活性と内因性 FAS 遺伝子発現を有意に低下させることが明らかになった。Allyl Isothiocyanate はワサビやカラシなどのアブラナ科植物に含まれる成分で、抗がん作用等の生理活性が報告されている。Chrysin はヒラタケや蜂の巣に含まれるフラボンの一種で、抗がん作用や抗炎症作用が報告されている。これらの化合物を Huh7 細胞に処理すると、前駆体 SREBP タンパク質量は低下せず、活性型 SREBP タンパク質量のみ低下することから、これらの化合物は活性型 SREBP タンパク質の分解亢進や、SREBP のプロセシング抑制などを介して活性型 SREBP タンパク質量を低下させていると考えられる。その詳細な分子機構については現在検討中である。

SREBP, Allyl Isothiocyanate, Chrysin

講演番号：3A08p08
講演日時：3 月 19 日 15:55～ A 校舎 08 会場

# クルクミンが食餌性肥満モデルマウスの精巣上体脂肪組織に及ぼす影響

# Effect of curcumin on epididymal adipose tissue in diet-induced obese mice

○小堀 真珠子、高橋 弓子、秋元 由香里、桜井 睦、大池 秀明、木村 俊之（農研機構食品研）
○Masuko Kobori, Yumiko Takahashi, Yukari Akimoto, Mutusumi Sakurai, Hideaki Oike, Toshiyuki Kimura (Food Research Institute, NARO)

【緒論】香辛料成分であるクルクミンは抗酸化作用、抗炎症作用、脂肪蓄積軽減作用等を示すことが報告されているが、その作用および作用メカニズムには不明な点も多い。これまでの研究において、内臓脂肪組織の遺伝子発現が肥満やメタボリックシンドロームの進行と共に大きく変化し、食品成分の機能性の特徴をよく反映することが明らかになってきたことから、本研究では、高脂肪・高ショ糖・高コレステロール食にクルクミンを添加して、食餌性肥満モデルマウスに及ぼすクルクミンの作用を検討した。
【材料および方法】C57BL/6J マウス（雄性、5 週齢）を 1 週間の馴化飼育後、AIN-93G（コントロール食）、高脂肪・高ショ糖・高コレステロール（西洋型）食または 0.1%クルクミン添加西洋型食（クルクミン添加西洋型食）を 16 週間摂取させた後、体重、組織重量、血糖値、血中脂質等を測定して、クルクミンが西洋型食による肥満及びメタボリックシンドロームに及ぼす影響を検討した。また精巣上体脂肪組織の酸化ストレスマーカーや遺伝子発現等を測定した。
【結果】クルクミンは、食餌性肥満モデルマウスの肝臓、腎臓、膵臓及び内臓脂肪組織の重量に影響を及ぼさず、血中脂質（コレステロール、遊離脂肪酸、トリグリセリド）濃度の有意な低下も認められなかった。しかし、体重の増加をわずかに抑制し、血糖値の上昇を有意に抑制した。また、クルクミンは血漿、肝臓及び精巣周囲脂肪組織において脂質過酸化のマーカーである 8-イソプロスタンまたはマロンジアルデヒドの濃度を大きく減少させた。これらのことからクルクミンが、食餌性肥満モデルマウスにおける血中脂質濃度の上昇や組織の脂肪蓄積に及ぼす影響は少ないが、血中及び組織においては強い酸化ストレス抑制効果を示すこと、また血糖値低下作用を示すことが明らかになった。そこで、コントロール食、西洋型食、0.1%クルクミン添加西洋型食を摂取したマウスの精巣周囲脂肪組織の遺伝子発現を網羅解析し、同モデルマウスにおいてメタボリックシンドローム抑制効果を示すケルセチンの作用と比較したので、報告する。

curcumin, epididymal adipose tissue, metabolic syndrome

発表責任者：小堀真珠子（kobori@affrc.go.jp）

講演番号：3A08p09
講演日時：3 月 19 日 16:10～ A 校舎 08 会場

# 1975 年型日本食摂取がヒトに与える効果

# The effect of 1975 model Japanese diet intake on human

○浅野 将希[1]、菅原 沙恵子[1]、串田 衛[1]、遠又 靖丈[2]、辻 一郎[2]、都築 毅[1] ([1]東北大院農、[2]東北大院医)
○Masaki ASANO[1], Saeko SUGAWARA[1], Mamoru KUSHIDA[1], Yasutake TOMATA[2], Ichiro TSUJI[2], Tsuyoshi TSUDUKI[1] ([1]Grad. Sch. Agri. Sci., Tohoku Univ., [2]Grad. Sch. Med. Sci., Tohoku Univ.)

【目的】日本は、その平均寿命の長さから長寿国として知られており、日本の食事である日本食が長寿の要因の一つとして考えられている。以前我々は、現代日本食と現代米国食を比較し、現代日本食は現代米国食よりも健康有益性が高いことを明らかとした [1]。また、様々な年代 （1960 年、1975 年、1990 年、2005 年） の日本食 （国民健康・栄養調査に基づいて調理作製） を比較したところ、1975 年の日本食が最も肥満になりにくく、糖尿病や脂肪肝を予防し、健康有益性が高いことを明らかとした [2-4]。本研究ではこれらの知見をもとに、1975 年の日本食の特徴を有した食事 （1975 年型日本食） がヒトにおいても有益な効果を発揮するかを証明するために、軽度肥満者に与える影響を現代食と比較・検討した。
【方法】1975 年の日本食の特徴を、過去の研究結果を基に検討し、この特徴を有した食事を 1975 年型日本食とし、軽度肥満者に与える影響を現代食 （日本人の食事摂取基準に準じた食事） と比較した。被験者 （BMI が 24 以上 30 以下の軽度肥満者：年齢 20～70 歳） を現代食群 （30 名） と 1975 年型日本食群 （30 名） に割り当て、それぞれの食事を 1 日 3 食、28 日間摂取させた。試験期間前後に、身体組成の測定、血液生化学検査を行い、健康有益性について評価した。
【結果】現代食群と比べて、1975 年型日本食群において BMI （体格指数） や体重が有意に減少した。また、血漿中の総コレステロールや LDL コレステロール、ヘモグロビン A1c が有意に減少し、それに対し HDL コレステロールが現代食群よりも有意に減少が抑えられた。血中単球の遺伝子発現を試験食摂取前後で比較すると、1975 年型日本食群において、慢性炎症と関わる遺伝子の発現量が現代食群と比べて大きく減少していた。
【考察】本研究で実施したヒト介入試験より、1975 年型日本食はヒトにおいて有益であることが示された。現代食摂取に比べて 1975 年型日本食摂取は軽度肥満者の体重を減少させ標準体型に近づけ、また、血漿中の総コレステロール及び LDL コレステロールを減少させることから動脈硬化や脂質異常症のリスクが減少する効果があることが示唆された。

[1] T. Tsuduki, et al., J Jpn Soc Nutr Food Sci, 61, 255-264 (2008).
[2] T. Honma, T. Tsuduki, et al., Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, 60, 541-553 (2013).
[3] Y. Kitano, T. Tsuduki, et al., J Jpn Soc Nutr Sci, 2, 73-85 (2014).
[4] K. Yamamoto, T. Tsuduki, et al., Nutrition, 32, 122-128 (2016).

japanese diet, human, obesity

講演番号：3A08p10
講演日時：3 月 19 日 16:25～ A 校舎 08 会場

*Lactobacillus gasseri* SBT2055 菌体の加熱処理が内臓脂肪蓄積抑制効果に及ぼす影響
The influence of heat treatment of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 on the reducing effect on accumulation of visceral adipose tissue
小川 哲弘、○三好 雅也、酒井 史彦、門岡 幸男（雪印メグミルク（株））
Akihiro OGAWA, ○Masaya MIYOSHI, Fumihiko SAKAI, Yukio KADOOKA (Megmilk Snow Brand Co., Ltd.)

【目的】 我々はこれまでに、プロバイオティクス乳酸菌である *Lactobacillus gasseri* SBT2055（LG2055）の内臓脂肪蓄積効果を動物試験およびヒト試験で明らかにしてきた。この LG2055 の効果についてはこれまで生菌体を用いて検討してきたが、死菌体での効果の有無については不明である。そこで、加熱処理したガセリ菌 SP 株が内臓脂肪蓄積抑制効果に与える影響を検討した。さらに、この内臓脂肪蓄積抑制効果のメカニズムである LG2055 による脂肪エマルジョン粒子径の増大作用について、菌体の加熱処理および破砕処理の影響を検証した。
【方法】 AIN-76 組成に準じた 10%脂肪飼料(C)、C に LG2055 の非加熱もしくは加熱処理(煮沸水中に 5 分間)した菌体を 0.5%添加した飼料(NG および HG)を作製した。これらを 8 週齢雄性 C57BL/6J マウスに 16 週間摂取させた。1 週間毎に体重を測定し、解剖時に腸間膜脂肪、副睾丸周囲脂肪、腎周囲・後腹膜脂肪、総内臓脂肪重量を計測した。LG2055 による *in vitro* での脂質エマルジョン粒子径増大作用を検証するために、トリオレイン、レシチン、タウロコール酸からなる脂質エマルジョンを調製した。脂質エマルジョンに LG2055 を添加して 37℃で 3 時間振盪した後、脂質エマルジョンの粒子径を粒度分布計を用いて測定した。
【結果と考察】 体重は、摂取開始から 8 週目以降において C 群に比べて NG 群で有意に減少した。また、副睾丸周囲脂肪、腎周囲・後腹膜脂肪、総内臓脂肪重量も C 群に比べて NG 群で有意に低下した。一方、HG 群は、C 群に比べて体重および内臓脂肪重量が低値を示したものの、統計学的有意差は認められなかった。LG2055 の内臓脂肪蓄積抑制効果は、LG2055 による脂質エマルジョン粒子径増大作用を介したリパーゼ抑制作用の関与が明らかとなっている。この脂質エマルジョン粒子径増大作用について加熱処理した LG2055 を評価した結果、加熱処理によって LG2055 の脂質エマルジョン粒子径増大作用は低下した。一方、LG2055 の菌体を破砕処理した場合には、脂質エマルジョン粒子径増大作用が維持された。
以上の結果から、LG2055 の内臓脂肪蓄積抑制効果は、菌体の加熱処理によってその効果が弱まることが明らかとなった。

metabolic syndrome, lactic acid bacteria, Lactobacillus gasseri SBT2055

発表責任者：三好 雅也（m-miyoshi@meg-snow.com）

講演番号：3A08p11
講演日時：3 月 19 日 16:50～ A 校舎 08 会場

# 発酵乳ケフィアが筋肉細胞の機能に及ぼす効果

# Effect of fermented milk Kefir to the function of muscle cells

○杉本 龍郎[1]、松元 拓也[1]、原田 大輔[2]、徳丸 浩一郎[3]、白畑 實隆[4]、照屋 輝一郎[1,2,4] ([1]九大院シス生、[2]九大院生資環、[3]日本ケフィア、[4]九大院農院)
○Tatsuro SUGIMOTO[1], Takuya MATSUMOTO[1], Daisuke HARADA[2], Koichiro TOKUMARU[3], Sanetaka SHIRAHATA[4], Kiichiro TERUYA[1,2,4] ([1]Grad. Sch. Sys. Life Sci., Kyushu Univ., [2]Grad. Sch. Biores. Bioenv. Sci., Kyushu Univ., [3]Nihon Kefir Co. Ltd., [4]Fac. Agr., Kyushu Univ.)

【目的】

メタボリックシンドロームは、内臓脂肪の蓄積などにより脂質代謝異常などの動脈硬化の危険因子が一個人に重積している状態である。当研究室では、発酵乳ケフィアのメタボリックシンドロームに対する有用性を研究してきた。本研究では、NKG ケフィアの抗酸化力および筋肉細胞のエネルギー代謝に及ぼす影響、また炎症状態の筋肉細胞に及ぼす影響を検討し、NKG ケフィアの筋肉細胞に及ぼす有益な効果を検討することを目的とした。

【方法】

ケフィア標品は、日本ケフィア株式会社から提供された粉末ケフィア（NKG ケフィア）ならびに高タンパク質ケフィア（NKG ケフィア HPT）を使用した。DPPH ラジカル消去活性試験を行うことで NKG ケフィアおよびサンプルの抗酸化能を評価した。また、分化誘導処理を行ったマウス C2C12 筋管細胞に NKG ケフィア処理を行った。48 時間処理後、WST-1/1-Methoxy PMS 溶液を添加した培地に交換し、WST-1 発色後、マイクロプレートリーダーにて波長 450 nm の吸光度を測定し細胞の呼吸活性を評価した。また、細胞を 10%ホルマリンで固定後 Hoechst 33342 染色により細胞数を測定することで、細胞当たりの呼吸活性の評価を行った。さらに、炎症状態の筋肉細胞に及ぼす影響を評価するために、分化誘導後の C2C12 筋管細胞に TNF-α処理を行い炎症状態を誘導した。処理後に細胞全 RNA を回収・cDNA 合成を行い、定量 RT-PCR にて筋肉の主要構成成分であるミオシンの関連遺伝子の発現量を測定した。

【結果・考察】

DPPH ラジカル消去活性試験の結果から、NKG ケフィアが抗酸化活性を有することが確認された。また、WST-1 アッセイと Hoechst 33342 染色の結果から、筋肉細胞 1 個当たりのエネルギー代謝を亢進させ、特に NKG ケフィア HPT においてこれらの活性が高いことが示唆された。以上のことから、NKG ケフィアが他サンプルと比べてエネルギー代謝亢進を介したメタボリックシンドロームの予防・改善効果を有することが期待された。また、定量 RT-PCR の結果から、NKG ケフィアが炎症状態で機能低下した筋肉細胞機能の回復または保護効果があることが示唆された。

Kefir, skeletal muscle, energy metabolism

講演番号：3A08p12
講演日時：3 月 19 日 17:05～ A 校舎 08 会場

# β2 アドレナリン受容体発現制御を介した食品成分による筋機能改善効果

Functional food factor improving skeletal muscle function by regulating expression of ß2 adrenergic receptor.

○近澤 未歩、清水 誠、井上 順、佐藤 隆一郎（東大院農生科・応生化）
○Miho CHIKAZAWA, Makoto SHIMIZU, Jun INOUE, Ryuichiro SATO (The University of Tokyo)

【背景】

加齢に伴う筋量や筋力の低下を主な特徴とするサルコペニアは、高齢者の転倒や寝たきりの原因となることから発症機構の理解や対策の立案が急がれる。G タンパク質共役受容体（GPCR）は 7 回膜貫通構造を持つ受容体ファミリーである。骨格筋における GPCR シグナルの活性化は、筋増強や筋機能改善に有用であることがこれまでに多数報告されており、筋疾患の治療や予防における標的として着目される。

【目的】

サルコペニア患者の増加を防ぐために、低濃度・長期間摂取することにより効果を発揮する機能性食品の開発が有効であると考えられる。そこで、骨格筋における GPCR の発現を亢進するような食品成分を見出し、作用機構解析を行いサルコペニア予防における有用性を明らかにすることを本研究の目的とした。今回、骨格筋における筋増強・筋機能改善効果が多数報告される GPCR である β2 アドレナリン受容体（β2AR）に着目し、検討を行った。

【方法・結果】

β2AR 上流のプロモーター領域の下流にルシフェラーゼ遺伝子を導入したプラスミドを C2C12 細胞（マウス筋芽細胞株）にトランスフェクションし、350 種類の食品成分についてレポーターアッセイによるスクリーニングを行った。その結果、複数の食品成分において、β2AR プロモーター活性の亢進を確認した。次に、活性が見られた食品成分について、Real Time PCR により β2AR の mRNA を測定したところ、食品成分投与による β2AR mRNA 発現の上昇が確認された。中でも、スチルベノイドポリフェノールである Resveratrol、イソフラボンである Genistein により、特に β2AR の mRNA が大きく上昇することが確認された。

食品成分による発現制御機構を明らかにするため、様々な長さの β2AR プロモータープラスミドを作製してレポーターアッセイを行い、重要な配列の絞り込みを行った。さらに、絞り込んだ配列を欠失・変異させたプロモーターを用いたレポーターアッセイで、プロモーター活性が低下することを確認した。現在、ノックダウン実験、過剰発現実験による発現制御に関与する転写因子の同定、食品成分を介した β2AR 発現制御機構の解明を進めている。さらに、サルコペニア発症に対する予防効果を証明するため、動物への投与実験、摂食実験を行っている。

GPCR, ß2AR, skeletal muscle

講演番号：3A08p13
講演日時：3 月 19 日 17:20～ A 校舎 08 会場

# GPCR 活性制御を介した骨格筋機能改善効果を有する食品成分の探索

Study on functional food factors that improve skeletal muscle function via GPCR activation

○浦本 麻里、近澤 未歩、清水 誠、井上 順、佐藤 隆一郎（東大院農生科・応生化）
○Mari URAMOTO, Miho CHIKAZAWA, Makoto SHIMIZU, Jun INOUE, Ryuichiro SATO (The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】

高齢化が急速に進展する現在、健康寿命を延伸させ、寝たきり・要介護の高齢者を減らすことが必要である。寝たきり・要介護の原因の 1 つとして、運動器の障害が挙げられる。そのため、十分な運動習慣の獲得が困難である高齢者に向けて、筋力の低下を防ぐための対策を講じることは非常に重要であると考えられる。骨格筋に発現する G タンパク質共役受容体（GPCR）の中で、リガンド結合により細胞内 cAMP を上昇させる受容体には筋増強効果や筋機能改善効果が報告されており、筋疾患の治療や予防における標的として着目されている。本研究では、筋増強・筋萎縮抑制効果を有する GPCR の 1 つである Corticotropin-releasing factor receptor 2（CRFR2）に着目し、受容体リガンド活性を有する食品成分の探索およびその作用機構の解析を行った。CRFR2 リガンド活性を有する食品成分により筋増強・筋機能改善効果を検証することを目的に以下の実験を試みた。

【方法・結果】

初めに、CRFR2 を活性化させる食品成分の評価系の構築を行った。GPCR はリガンド結合によりシグナル伝達が起こることで細胞内 cAMP が上昇する。cAMP 上昇に伴い活性化される転写因子 CREB の応答配列の下流にルシフェラーゼ遺伝子を導入したベクター（CRE-Luc）とマウス CRFR2 発現ベクターをヒト腎臓由来細胞 HEK293 細胞にて共発現させた後、350 種の食品精製化合物を培地に添加し、24 時間後にレポーターアッセイにてリガンド活性を評価した。その結果、5 種類の食品成分において、CRFR2 特異的に下流シグナルの活性化が起こることが明らかとなった。これらの成分は、3 μM といった低濃度でも受容体活性化効果を持つことが確認された。さらに、3 種類の成分においては、CRFR2 の内因性リガンドである Urocortin2（Ucn2）と共投与することで、Ucn2 の CRFR2 活性化能を高める効果を有することが明らかとなった。また、この効果はヒト CRFR2 においても確認することができた。現在は、これらの成分の受容体活性化効果および Ucn2 との相乗効果を、マウス筋芽細胞株である C2C12 細胞とマウスを用いて、in vitro と in vivo の両面から検証を進めている。

GPCR, skeletal muscle, hypertrophy

講演番号：3A08p14
講演日時：3 月 19 日 17:35～ A 校舎 08 会場

PGC-1α や FOXO1 を用いた骨格筋機能評価系の構築
Establishment of screening system for the skeletal muscle function using PGC-1α or FOXO1
○守田 昭仁[1]、長池 祐太[1]、竹内 彩夏[1]、中川 匠[1]、望月 祐介[1]、亀井 康富[2]、三浦 進司[1]([1]静岡県大食品栄養、[2]京都府大生命環境)
○Akihito MORITA[1], Yuta NAGAIKE[1], Ayala TAKEUCHI[1], Takumi NAKAGAWA[1], Yusuke MOCHIZUKI[1], Yasutomi KAMEI[2], Shine MIURA[1] ([1]Univ. of Shizuoka, [2]Kyoto Pref. Univ.)

【背景・目的】
高齢化を迎える現代社会ではサルコペニアや不活動、ベッドレストが要因となる廃用性筋萎縮が社会問題となっている。高齢者では身体ロコモーション機能・骨格筋機能が衰弱していることが多い。健康長寿を維持するには骨格筋機能を正常に維持することが重要となっているが、骨格筋機能低下に対して現在推奨されている処置方法は効果が不十分で、実行自体が不可能な場合が多く、また薬物療法が存在しない。運動トレーニングにより発現が増加する転写調節因子 PGC-1α は骨格筋の持久力向上を引き起こす。他方、不活動や低栄養により骨格筋で発現量が増加する転写調節因子 FOXO1 が筋萎縮を引き起こす。これらの転写調節因子の機能を制御することができれば、骨格筋機能を正常に維持することができるはずである。本研究ではこれら２つの転写調節因子の機能を簡便に測定する系を構築した。
【方法】
たんぱく質間相互作用を調べる手法である Two-hybrid 法を応用して、PGC-1α や FOXO1 と酵母由来の GAL4-DBD を結合した発現ベクターと、GAL4DBD と結合する UAS 配列の下流にホタル由来のルシフェラーゼを組み込んだ発現ベクターを導入した HEK293T 細胞に各種化合物を添加することでルシフェラーゼ活性の変動を測定した。また、PGC-1α や FOXO1 は、転写因子と共役して働くので、様々な核内受容体を組み込んだ発現ベクターも共発現させ、転写因子間の相互作用も測定した。
【結果・考察】
細胞内の AMP キナーゼを活性化する 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR)は PGC-1α 活性を増加させた。FOXO1 inhibitor として報告されている AS1708727 は FOXO1 活性を低下させた。様々な核内受容体のリガンドは添加 6 時間で活性化したが、AICAR の作用発現には添加２４時間が必要であった。食品由来の化合物 8 種類をこれらの系で評価したところ、化合物毎に異なる反応を示した。今回構築した評価系は食品機能の解析に有用と考えられる。

PGC-1α, FOXO1, muscle function

発表責任者：守田昭仁（moritaa@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：3A08p15
講演日時：3 月 19 日 17:50～ A 校舎 08 会場

Protein Kinase Inhibitor による筋萎縮抑制作用
A protein kinase inhibitor prevents skeletal muscle atrophy
○中川 匠[1]、守田 昭仁[1]、竹内 彩夏[1]、長池 祐太[1]、佐山 音緒[1]、渡辺 優衣[1]、小郷 尚久[1]、浅井 章良[1]、亀井 康富[2]、三浦 進司[1] ([1]静岡県大院、[2]京都府立大生命環境)
○Takumi NAKAGAWA[1], Akihito MORITA[1], Ayaka TAKEUCHI[1], Yuta NAGAIKE[1], Neo Sayama[1], Yui WATANABE[1], Naohisa OGO[1], Akira ASAI[1], Yasutomi KAMEI[2], Shinji MIURA[1] ([1]Univ. of Shizuoka, [2]Kyoto Pref. Univ.)

【背景・目的】
高齢化が進み、サルコペニアや不活動、ベッドレストが要因となる廃用性筋萎縮が社会問題となっている。健康長寿社会実現のため、高齢者の身体ロコモーション機能、特に筋機能維持が不可欠である。筋機能維持には筋持久力の向上や筋量増加が求められるため、運動トレーニングや適切な栄養素摂取が重要である。しかし、筋機能低下に対して現在推奨されている処置方法は効果が不十分であることや実行自体が不可能な場合が多く、また薬物療法が存在しないため、筋機能の低下防止はアンメットメディカルニーズである。不活動や低栄養により骨格筋で発現量が増加する転写共役因子 FOXO1 が筋萎縮を引き起こすことが報告されている。本研究では、FOXO1 活性を抑制する物質を Protein Kinase Inhibitor Screening (KIS) library から探索し、陽性化合物の筋萎縮予防作用を解析した。
【方法】
(1)たんぱく質間相互作用を調べる手法である Two-hybrid 法を応用して、FOXO1 やルシフェラーゼなどを各々組み込んだ発現ベクターを HEK293T 細胞に導入し、各種化合物存在下で培養後、ルシフェラーゼ活性を測定することで FOXO1 活性とした。(2) C2C12 を筋管細胞へと分化させた後、筋萎縮を誘発する Dexamethasone(DEX)と同時に陽性化合物を添加することで筋萎縮予防作用を調べた。(3)一晩絶食させたマウスに陽性化合物を経口投与した後、腓腹筋を摘出し、SUnSET 法を用いてタンパク合成速度を調べた。
【結果・考察】
(1) FOXO1 inhibitor として報告されている AS1708727 は、FOXO1 活性を低下させた。また、270 種類の KIS library の中から FOXO1 活性を抑制する 2 つの陽性化合物(KIS-086, KIS-154)を見いだした。(2) C2C12 筋管細胞を DEX で処理した場合に生じる筋萎縮関連遺伝子の発現増加は、KIS-154 添加で抑制された。(3)KIS-154 を経口投与したマウスの骨格筋タンパク質合成速度は上昇した。今回の結果は FOXO1 評価系で見いだした KIS-154 が筋萎縮予防作用を有することを示唆している。

protein kinase inhibitor, muscle atrophy, SUnSET

発表責任者：守田昭仁（moritaa@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：3A08p16
講演日時：3 月 19 日 18:05～ A 校舎 08 会場

# 卵白ペプチドによる運動模倣効果が筋肥大を促進する

# Exercise-mimetic effects by egg white-derived peptides induce skeletal muscle hypertrophy

○松原 守[1]、鈴木 智之[1]、坂下 真耶[3]、伊納 義和[2]、古野 忠秀[2]、堀江 健二[3]、金 武祚[3]([1]京都学園大・バイオ環境、[2]愛知学院大・薬、[3]株式会社ファーマフーズ・開発部)
○ Mamoru MATSUBARA[1], Tomoyuki SUZUKI[1], Maya SAKASHITA[3], Yoshikazu INOH[2], Tadahide FURUNO[2], Kenji HORIE[3], Mujo KIM[3] ([1]Kyoto Gakuen Univ., [2]Aichi Gakuin Univ., [3]PHARMA FOODS INTERNATIONAL CO, LTD)

【目的】

超高齢化社会において、加齢やさまざまな疾患に伴う筋萎縮が深刻な問題となっており、筋肥大を促進するタンパク質合成経路の活性化や筋萎縮を促進するタンパク質分解経路の抑制が筋萎縮に対する予防戦略となっている。骨格筋を肥大させる手段として筋肉トレーニングが最も有効な手段として考えられているが、苦痛や心血管系への負担は避けられない。そこで薬、食品、サプリメントを摂取することで運動の代りとなる「エクササイズピル」あるいは「運動機能性食品」として筋肥大を促すための機能性成分の同定が必要である。

我々は機能性に優れた卵白ペプチドに着目し、これまで運動パフォーマンスの向上作用や血管拡張作用などの様々な機能性を見出してきた。本研究では、培養細胞および動物を用いて卵白ペプチドの筋肥大シグナル活性化の分子メカニズムについて調べ「運動機能性食品」としての可能性があるかを検証した。

【方法】

C2C12 細胞(マウス由来筋芽細胞)を分化誘導した筋管細胞に卵白ペプチドを添加し、筋肥大において重要な役割を担う p70 S6kinase(p70S6K)のリン酸化を Western blot 法で検出した。また、運動負荷によるタンパク質合成経路で重要な役割を担っている神経型一酸化窒素合成酵素(nNOS)により誘起されるカルシウムシグナル経路の活性化について各種シグナル因子の阻害剤を用いて検証した。更に共焦点レーザー顕微鏡を用いた細胞内カルシウム濃度の可視化実験により卵白ペプチドによって細胞内カルシウムの上昇を引き起こすかどうかを観察した。マウスを用いた動物実験により卵白ペプチド摂取により筋肉量が増加するかを調べた。

【結果・考察】

卵白ペプチドは nNOS の活性化は誘起しないものの筋小胞体にあるカルシウムチャネルを活性化させ、細胞内カルシウム濃度依存的に p70S6 をリン酸化することが示唆された。また、卵白ペプチド添加によって細胞内のカルシウム濃度が急激に上昇することが明らかとなった。更にマウスを用いた動物実験において、卵白ペプチドを摂取させた群では筋肉量が有意に増加していた。このように、卵白ペプチドは運動負荷と同様にカルシウム依存的な経路で骨格筋の筋肥大を促進することが明らかとなり、「運動機能性食品」としての効果が期待できる成分であることが分かった。

Skeletal muscle hypertrophy, Egg white derived peptides, Sarcopenia

発表責任者：松原守（mmatsuba@kyotogakuen.ac.jp）

講演番号：3B09a01
講演日時：3 月 19 日 09:20～ B 校舎 09 会場

抱合酵素発現酵母株を用いたメチル化ケルセチン抱合代謝物の合成
Whole cell dependent-production of methylated quercetin conjugates using genetically engineered yeast cells expressing UGT or SULT isoforms.
○生城 真一、岩本 明日夏、藤井 美春、西川 美宇、濱田 昌弘、中島 範行、安田 佳織、榊 利之（富山県大・工・生物工）
○ Shinichi IKUSHIRO, Asuka IWAMOTO, Miharu FUJII, Miyu NISHIKAWA, Masahiro HAMADA, Noriyuki NAKAJIMA, Kaori YASUDA, Toshiyuki SAKAKI (Dep. of Biotech., Fac. of Engineer., Toyama Pref. Univ.)

【目的】ポリフェノールなどの食品中機能性成分は異物代謝酵素である UDP-グルクロン酸転移酵素（UGT）や硫酸基転移酵素（SULT）による変換反応を受け、その体内動態や機能性が大きく変化する。機能性ポリフェノールであるケルセチンはこれらの抱合代謝とともにメチル化されてさらに複雑な代謝経路をたどるが、抱合代謝物の化学合成は困難である場合が多く、代謝物の同定及び定量を正確に評価できていないのが現状である。当研究室においては出芽酵母発現系を用いた UGT や SULT などの異物抱合酵素による抱合体調製技術を開発してきた(1,2)。本研究では出芽酵母発現系を用いたヒト由来抱合酵素群によるメチル化ケルセチンの抱合代謝物合成技術の開発をおこなった。
【方法】 染色体組み込み型発現ベクター(pAUR)を用いて UDP-グルクロン酸を供給するラット由来 UDP-グルコース脱水素酵素（UGDH）及びヒト由来 UGT 分子種 cDNA（UGT1A:9 種,UGT2B： 4 種,UGT2A：1 種）を出芽酵母 AH22 株に遺伝子導入し同時発現させた. 硫酸抱合体産生系については自律複製型発現ベクター(pGYR)を用いて 6 種のヒト SULT 分子種 cDNA(1A1,1A3,1B1,1C4,1E1,2A1)を発現させた酵母株を構築した。
【結果】異物抱合酵素発現酵母株の静止菌体にメチル化ケルセチンを添加することで、グルクロン酸あるいは硫酸抱合体を得ることが可能であり、UGT あるいは SULT 分子種に依存して異なる水酸基が抱合化をうけることが示された。また、ラット由来酵素との比較により抱合化を受ける部位に動物種差がみられた。さらにメチル化ケルセチンの硫酸抱合体については、市販されているサルファターゼによる加水分解反応に対して特定の部位に位置する硫酸基が抵抗性をもつことが示された。現在、数種類のイソラムネチン抱合体については大量合成により標品を調製して LC-MS 及び NMR による構造解析を進めている。
【結論】ヒト由来抱合酵素発現酵母株を用いたメチル化ケルセチンの抱合体の構造決定により、生体内において異物代謝酵素によって生成されるメチル化修飾を含んだケルセチン代謝物の網羅的な同定が可能となり、複数の修飾を受けた代謝物の体内動態や機能性に対するより詳細な解析に寄与できると考えている。

(1) Ikushiro S, *et al*., Biosynthesis of Drug Glucuronide Metabolites in the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Pharmaceutics* **13**, 2274-2284 (2016)
(2) 遺伝子改変酵母を用いた硫酸抱合体の製造方法(特許第5771405号)

Methylated quercetin, Conjugation, Yeast

発表責任者：生城真一（ikushiro@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：3B09a02
講演日時：3 月 19 日 09:35～ B 校舎 09 会場

# 異なるモデル動物におけるエステル化フェルラ酸およびカフェ酸の抗老化作用

# Anti-aging effects of esterified ferulic acid and caffeic acid on various models

○丹治 典子[1]、宮崎 穂菜実[3]、橋 友理香[4]、三谷 塁一[2]、米倉 真一[2]、片山 茂[1]、中村 宗一郎[1] ([1]信州大院・農、[2]信州大・先鋭領域融合、[3]信州大院・総合工、[4]信州大農)
○ Noriko TANJI[1], Honami MIYAZAKI[3], Yurika HASHI[4], Takakazu MITANI[2], Shinichi YONEKURA[2], Shigeru KATAYAMA[1], Soichiro NAKAMURA[1] ([1]Grad. Sch. Agric. Shinshu univ., [2]Shinshu univ. ICCER, [3]Interdisc. Gsd. Sch. Sci. and Technol. Shinshu univ., [4]Shinshu univ.)

【背景・目的】神経変性疾患は，酸化ストレス等により変性したタンパク質が凝集体を形成し，神経細胞に沈着して細胞死を誘導することで生じる。熱ショックタンパク質（Heat Shock Protein, HSP）は分子シャペロンとして細胞内でのタンパク質品質管理を担うことから，HSP の発現増強は種々の神経変性疾患に対する予防効果が期待される。我々はこれまでに，酵素合成により調製したフェルラ酸エステルが SK-N-SH 細胞において HSP70 発現誘導作用を有することを明らかにした。そこで本研究では，より生体に近いモデルに及ぼす影響を明らかにするため，マウス初代培養ニューロン，アミロイドβ（Aβ）過剰発現バエ，および線虫（*Caenorhabditis elegance*）を用いて，種々の抗老化作用について検討した。また，これらの効果がフェルラ酸エステルだけで得られるものかを検証すべく，カフェ酸エステルについても検討した。
【方法】炭素鎖長の異なるアルキルアルコール，基質となるフェノール酸（フェルラ酸およびカフェ酸）と固定化リパーゼ（Novozyme 435，リパーゼ PS IM アマノ）と混合し，溶媒にヘキサンを用いて，60°C で 72 h の反応により，様々な鎖長の炭素鎖を導入した。得られた化合物は固相抽出（カラム：Inertsep C18，溶媒：50-100%メタノール）により精製した。マウス初代培養ニューロンに各試料を 4 h 添加後，リアルタイム PCR 法で HSP70 遺伝子発現量を測定した。線虫は 25°C 以上で次世代を産出しない株を用い，培養は Brenner の方法に従って行った。同調培養 3 日目に各試料と抗生物質を添加し，数日ごとに生存数を計測して寿命を測定した。Aβ過剰発現バエにおいては，各試料の混餌試料を 30 日間摂取させた後，クライミングアッセイにより運動能力を評価した。
【結果及び考察】初代培養ニューロンにおける HSP70 発現量を測定した結果，ブチル化フェルラ酸の添加により HSP70 発現量の顕著な増加が認められた。Aβ過剰発現バエにフェルラ酸誘導体を 30 日間摂取させたところ，対照群ではAβ過剰発現によって経時的に運動能力は低下したが，ブチル化フェルラ酸摂取群では，顕著な運動能力の改善効果が示された。線虫にエステル化フェノール酸を 2 週間摂取させた結果，フェルラ酸，ブチル化フェルラ酸，およびヘキシル化カフェ酸で寿命延長作用が示された。このうち，ヘキシル化カフェ酸において最も寿命が長くなった。以上の結果より，中鎖脂肪鎖の導入は抗老化作用を付与するが，それぞれの効果においては最適な構造が存在することが示唆された。

pherulic acid, C. elegans, anti-aging effect

講演番号：3B09a03
講演日時：3 月 19 日 09:50～ B 校舎 09 会場

# ケトン体（3-ヒドロキシ酪酸）の化粧品としての効能

# Efficacy of ketone bodies (3-hydroxybutyric acids) as cosmetics

○盤若 明日香[1]、西村 拓[1]、松下 功[1]、坪田 潤[1]、河田 悦和[2] ([1]大阪ガス、[2]産総研)
○Asuka HANNYA[1], Taku NISHIMURA[1], Isao MATSUSHITA[1], Jun TSUBOTA[1], Yoshikazu KAWATA[2] ([1]Osaka Gas Co., Ltd., [2]Biomed. Res. Inst., AIST)

(概要)
3-ヒドロキシ酪酸（3-hydroxybutyric acid, 3HB)は生体内で産生されるケトン体の一種であり、脳機能の改善や糖尿病改善等様々な生理機能が報告され近年注目を集めている。大阪ガスではこれまでに好塩好アルカリ性細菌 *Halomonas* sp. KM-1 株を用いて、3HB の生産技術を確立してきた。
本研究では 3HB の化粧品原料としての開発をめざし、化粧品原料の 3 大テーマであるしみ、しわ、薄毛を解決する美白、抗老化、保湿、抗酸化の 4 つの基本的効能に対する試験を行った。
(方法)
3HB の抗老化、抗酸化に対する影響を調べるため、ヒト皮膚繊維芽細胞及び表皮細胞の NADH 産生能を MTT 還元法により評価した。また、美白に対する影響を調べるため、3HBNa 添加によるヒト色素細胞のチロシナーゼ活性阻害作用を評価した。さらに、保湿に対する影響を調べるため、3HBNa 添加によるヒト前腕部内側の各層水分量の変化を調べた。
(結果)
NADH 産生能評価において、繊維芽細胞では 3HBNa 添加により NADH 産生能の優位な増大が確認され、その増加は特に老化細胞において顕著だった。表皮細胞においても、同様に 3HBNa 添加により NADH 産生能の優位な増大が確認され、とくに分化誘導が促進されていると考えられるコンタクトインヒビジョン細胞で顕著だった。美白能評価において、3HBNa 添加により細胞内チロシナーゼ活性の濃度依存的な優位な低下が認められた。さらに、保湿能評価において、3HBNa 添加により塗布 30 分まで皮膚保保湿能の濃度依存的向上が認められた。

ketone body, anti-aging, cosmetics

発表責任者：盤若明日香（a-hannya@osakagas.co.jp）

講演番号：3B09a04
講演日時：3 月 19 日 10:05～ B 校舎 09 会場

# カドミウムの脳機能障害に関する研究

Study of Brain dysfunction by cadmium

○吉城 由美子、和田 恭平、田中 陽祐、アラッツア ロサス、嵯峨 絢花、福井 里奈 (石川県大)
○Yumiko Yoshiki, Kyohei Wada, Yosuke Tanaka, Rosas Aratza, Ayaka Saga, Rina Fukui (Ishikawa Univ)

【目的】

カドミウム（Cd）は 1817 年に発見された重金属である。古くから蓄積毒として知られ、腎臓、肝臓などの臓器障害を中心として研究が行われてきた。しかし、Cd が発ガン性物質として分類されたのは、意外にも 2004 年になってからであり（National toxicology program）、2010 年を境に Cd の暫定耐用摂取量の見直しが FAO/WHO を中心に行われている。近年では中枢神経に蓄積することで老化の進行や学習能力に影響を与えることが報告され、神経毒としての危険性も懸念されている。そこで、本研究では Cd 投与マウスの行動変化を調べ、脳の機能障害へおよぼす影響について検討した。

【実験方法】

3 週齢の C57BL/6J マウス（♂10 匹と♀10 匹）を実験動物として用いた。2 週間の予備飼育後、雌雄群をそれぞれ 2 群にわけ、水群（♂、♀）と Cd 群（♂、♀）の計 4 群（n=5）とした。Cd 群には 0.3 mg/kg/day となるように調製した $CdCl_2$ 水を与えた。飼育 42 日目に明暗箱、オープンフィールド、物体認識試験の 3 種類の行動試験を行った。飼育 85 日目に解剖を行い、肝臓、腎臓、膵臓、大腿骨、脳、脂肪組織（精巣上体脂肪、卵巣周囲脂肪）を採取した。血液の一般分析を一部委託測定した（長浜サイエンスラボラトリー）。脳の面積は Leatherland らの簡便法を用いて測定した。臓器の Cd 含量を原子吸光光度計（Z-2710、HITACHI）で測定し、脳の組織観察を HE 染色で行った。肝臓、腎臓の MT、MT2、SMP30、脳の BACE、PS1、カタラーゼ、SMP30 の mRNA 発現量をリアルタイム PCR で測定した。

【結果】

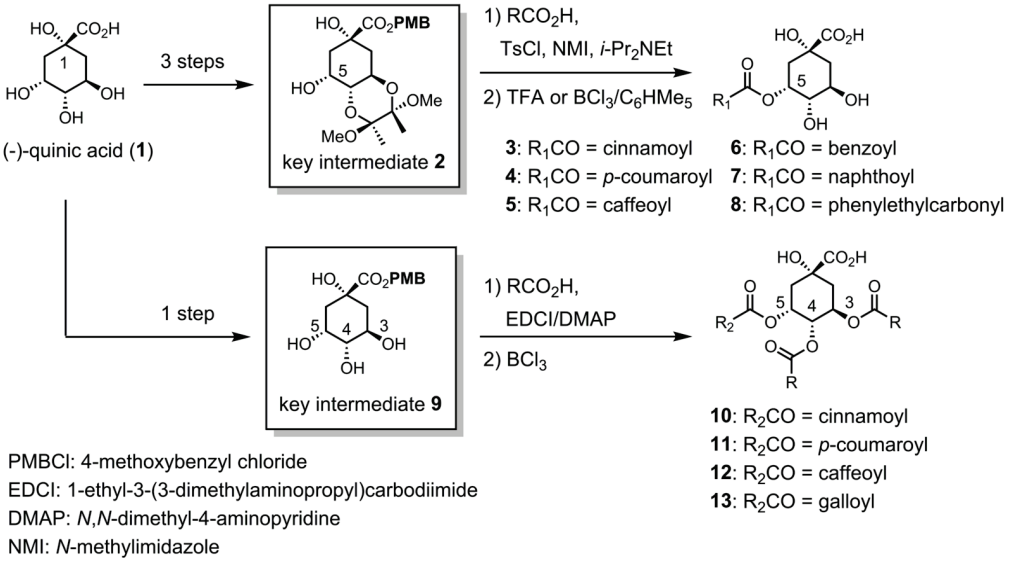
体重は、性別による有意差のみで、水群と Cd 群による違いは見られず、また、血清分析の結果でも、腎臓や肝臓障害に関する知見は得られなかった。したがって、今回投与した Cd 量では成長阻害や臓器障害は発生していないと判断した。各臓器の Cd 含量を比較すると、大腿骨、脂肪組織では肝臓、膵臓の約 1/10 量、腎臓の約 1/100 量であった。脳の Cd 含量は Cd♂群で 0.039±0.015 μg/g、Cd♀群で 0.031±0.009 ±0.009 となり、大腿骨、脂肪組織と同程度の値となった。また、性別による有意差は見られなかった。一方で、オープンフィールドによる不安行動試験は、中心部に滞在した時間が水♂群、20.4±11.3 秒、Cd♂群、45.6±17.0 秒と Cd 群で有意に増加した。Cd 投与によるこの影響は♂群のみで観察されたことから、♂群では不安感の鈍化が♀群よりも進行しやすいことが示唆された。

Cadmium, brain dysfunction, behavioral disorder

講演番号：3B09a05
講演日時：3 月 19 日 10:20～ B 校舎 09 会場

アミロイド線維形成を阻害するアシル化キナ酸類の合成
Synthesis of acylquinic acids possessing inhibitory　effect of amyloid fibril formation
○石原 健広[1]、渡邊 紀之[1]、山田 智美[1]、尾山 公一[2]、重光 佳基[3]、天野 名都子[3]、廣明 秀一[3]、近藤 忠雄[1]、吉田 久美[1] ([1]名大院情報科学、[2]名大物国セ、[3]名大院創薬)
○Takehiro ISHIHARA[1], Noriyuki WATANABE[1], Tomomi YAMADA[1], Kin-ichi OYAMA[2], Yoshiki SHIGEMITSU[3], Natsuko TENNO[3], Hidekazu HIROAKI[3], Tadao KONDO[1], Kumi YOSHIDA[1] ([1]Grad. Sch. Info. Sci., Nagoya Univ., [2]RCMS., Nagoya Univ., [3]Grad. Sch. Phar. Sci., Nagoya Univ.)

【目的】カフェオイルキナ酸は、アルツハイマー病の原因とされるアミロイド線維の形成を阻害し脳の神経細胞を保護する働きがある。分子内のカフェ酸の数が増えるほど形成阻害効果が強いと報告されているが阻害機構の詳細は不明である[1)]。本研究では、この阻害機構を明らかにすることを目的に、多様なアシル化キナ酸類を効率的に合成する方法の確立を目指した。高収率かつ短段階で標的化合物を合成するため、遊離カルボン酸を用いてアシル化する方法を開発し、5-*O*-アシル化キナ酸及び 3,4,5-*O*-トリアシル化キナ酸を合成した。
【方法と結果】(−)-キナ酸 (**1**)の 1 位に PMB 基を導入した鍵中間体 **2** 及び **9** をそれぞれ合成した。**2** の 5-ヒドロキシ基を田辺らの方法[2)]を改良したカルボン酸/TsCl/NMI/*i*-$Pr_2$NEt の条件で直接アシル化した後[3)]、脱保護することで 5-アシル化キナ酸 **3-8** を合成した[3)]。一方、**9** ではカルボン酸/EDCI/DMAP の条件でトリアシル化体を得た後脱保護し、トリアシル化キナ酸 **10-13** を合成した。現在、合成したアシル化キナ酸類のアミロイド線維形成阻害効果を調べている。




1) Yusaku, M., et al., *Bioorgan. Med. Chem.,* **2012**, *20*, 5844-5849.
2) Wakasugi, K., et al., *Adv. Synth. Catal.,* **2003**, *345*, 1209-1214.
3) Oyama, K., et al., *Tetrahedron,* **2015**, *71*, 3120-3130.

synthesis of 3,4,5-tri-O-acylquinic acids, 5-O-acylquinic acids, amyloid formation inhibitors

講演番号：3B09a06
講演日時：3 月 19 日 10:45～ B 校舎 09 会場

高脂肪食によるマウス聴力老化の遅延
High fat diet retards onset of age-related hearing loss in mice
○大池 秀明、伊藤 奈々子、桜井 睦、神山 かおる、小堀 真珠子（農研機構／食品研）
○Hideaki OIKE, Nanako ITO, Mutsumi SAKURAI, Kaoru KOHYAMA, Masuko KOBORI (NARO/NFRI)

動物の老化現象の一つに聴力の低下がある（加齢性難聴）。高音域から徐々に進行することが知られており、ヒトの可聴領域ギリギリの 17 kHz 程度の音はモスキート音と呼ばれ、10 代の若者には聞こえるが 20 代以上の成人ではほとんどの人が聞こえない。このことからわかるように、非常に高い音域では、20 代あたりから加齢性難聴は始まり、加齢とともに可聴限界が下がってくる。最近では、この現象を利用して、パソコンやスマホを利用した聴力年齢判定アプリなども広まっている。加齢性難聴は、ヒトに限らず、多くの動物で普遍的な老化現象であり、実験マウスも例外ではなく、汎用されている C57BL/6 マウスでは、半年齢あたりから高音域（20-30 kHz）の聴力低下が検出できる。我々は、これを利用して、聴力老化に影響する食事や食品の研究を進めている。これまで、他者の知見も含め、カロリー制限や、コエンザイム Q10、アンチエイジング乳酸菌の摂取等により、加齢性難聴の進行を抑制できることが明らかになっている。今回、我々は、マウスに高脂肪食を摂取させることで、加齢性難聴の進行が遅延されることを見出したので報告する。オスの C57BL/6J マウスに、3 ヶ月齢から 9 ヶ月齢までの 6 ヶ月間、固形の標準食（AIN93G）あるいは、高脂肪食（カロリーの 60%が脂肪）を与えて飼育した（1 群 8 匹）。これまでの知見と同様に、高脂肪食群は明らかな肥満を呈し、体重、血糖値、コレステロール等で有意な高値を示した。それぞれの群について、3, 6, 9 ヶ月齢における 8, 16, 24, 32 kH の聴力を聴性脳幹反応試験により測定したところ、どちらの群においても、加齢依存的な高音域の聴力低下が認められた。しかしながら、6, 9 ヶ月齢における 24, 32 kHz の聴力は高脂肪食群の方が有意に良い値を示し、加齢性難聴の進行が遅いことが明らかになった。9 ヶ月齢の聴力測定後にマウスを解剖し、内耳組織切片から聴覚神経細胞および有毛細胞を計数した。これらの細胞は加齢とともに減少し、加齢性難聴の原因となることが知られているが、その知見と一致するように、高脂肪食群では、加齢に伴う細胞減少が抑制されていた。また、別のコホートにおいても同じ結果が得られ、再現性も確認された。これまで、加齢性難聴の進行には酸化ストレスによる聴覚神経細胞死が関係していると考えられており、高脂肪食は、肥満による酸化ストレスを増加させることから、上記の結果は意外である。今回、市販の固形餌を利用したが、両群の餌の物性を解析したところ、大きな違いがあることが判明した。餌の硬さが加齢性難聴に影響することは知られていないが、骨格の構造上、顎関節と耳はごく近傍に存在しており、影響を及ぼす可能性は十分に考えられる。現在、硬さの違う餌による加齢性難聴の影響を調べており、本大会で併せて報告する。

aging, high fat diet, mouse

発表責任者：大池秀明（oike@affrc.go.jp）

講演番号：3B09a07
講演日時：3 月 19 日 11:00～ B 校舎 09 会場

腸間膜リンパ節樹状細胞および T 細胞のレチノイン酸に関わる応答の加齢による変化
Effects of aging on responses related to retinoic acid by mesenteric lymph node dendritic cells and T cells

○高野 智弘[1,2]、上滝 隆太郎[1,2]、宮川 拓也[1]、朴 知賢[1]、塩河 亜弥[1,2]、好田 正[3]、足立(中嶋) はるよ[1,2]、田之倉 優[1]、八村 敏志[1,2] ([1]東大院農生科・応生化、[2]東大院農生科・食の安全研セ、[3]東農工大農・応生化)
○Tomohiro Takano[1,2], Ryutaro Kotaki[1,2], Takuya Miyakawa[1], Jihyun Park[1], Aya Shiokawa[1,2], Tadashi Yoshida[3], Haruyo Nakajima-Adachi[1,2], Masaru Tanokura[1], Satoshi Hachimura[1,2] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. Tokyo, [2]Res. Cent. Food safety, Univ. Tokyo, [3]Dept. Appl. Biol. Chem., Tokyo Univ. Agric. Tech.)

【目的】ビタミン A 代謝産物であるレチノイン酸は、T 細胞に作用することで腸管指向性ホーミングレセプター(C-C chemokine receptor type 9; CCR9)や、制御性 T 細胞の分化に関わる転写因子 Foxp3 の発現を誘導することが報告されており、腸管免疫応答の制御に重要であると考えられる。レチノイン酸の産生に関わるレチノイン酸合成酵素(retinal dehydrogenase 2; RALDH2)は、腸管において腸間膜リンパ節(mesenteric lymph node; MLN)の樹状細胞(dendritic cell; DC)に高発現していることが知られている。当研究グループでは、MLN DC が細胞表面分子 CD103、CD11b および PD-L1 により 4 つのサブセットに分離できることを示し、中でも $CD103^{+}CD11b^{-}PD\text{-}L1^{high}$ サブセットにおいて RALDH 活性が最も高いことを見出している。一方、加齢に伴い免疫機能が低下すると言われるが、その実態は未解明な部分が多い。そこで本研究では、レチノイン酸に関わる免疫応答における加齢の影響を明らかにすることを目的に、加齢マウスを用い、１）抗原を取り込む MLN DC 中の各サブセットの割合および RALDH 活性の変化、２）DC に提示された抗原を認識して機能する T 細胞の CCR9 および転写因子 Foxp3 の発現能について解析した。
【方法】BALB/c 若齢マウス(2~4 ヶ月齢)、加齢マウス(18~22 ヶ月齢)の MLN DC についてフローサイトメトリーにより MLN DC 中の各サブセットの割合および RALDH 活性を測定した。また卵白アルブミン特異的 T 細胞抗原レセプターを発現する DO11.10 マウスおよび RAG2KO DO11.10 マウスの若齢マウス(2~4 ヶ月齢)および加齢マウス(16~22 ヶ月齢)由来脾臓 $CD4^{+}$ T 細胞と BALB/c マウス(2~4 月齢)由来 MLN DC を抗原ペプチドの存在下で培養後、CCR9 および Foxp3 の発現レベルをフローサイトメトリーにより解析した。
【結果】若齢マウスと比較して加齢マウスで MLN DC 中の $CD103^{+}CD11b^{-}PD\text{-}L1^{high}$ サブセットの割合および RALDH 活性が低下する傾向が見られた。また若齢マウスと比較して加齢マウス由来 $CD4^{+}$ T 細胞の抗原刺激により誘導された CCR9 および Foxp3 の発現レベルは有意に低下していた。本研究の結果から、加齢マウスにおいて MLN DC のサブセットの割合および RALDH 活性の変化によりレチノイン酸産生能が減少し、また T 細胞も抗原やレチノイン酸に対する反応性が減少し、これらが複合して腸管における免疫応答に影響することが示唆された。

aging, dendritic cells, T cells

発表責任者：八村敏志（ahachi@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3B09a08
講演日時：3 月 19 日 11:15～ B 校舎 09 会場

# 中高齢マウスを用いた餌中タンパク質含量の違いによる筋再生への影響

# Effect of skeletal muscle regeneration when fed different amounts of protein in diet using middle-aged mice

○増冨 裕文[1,2]、糸山 隆一[3]、石原 克之[3]、伊藤 政喜[3]、石神 昭人[1]([1]都健康長寿研、[2]東医歯大・院医歯、[3]カルビー（株））
○ Hirofumi MASUTOMI[1,2], Ryuichi ITOYAMA[3], Katsuyuki ISHIHARA[3], Masayoshi ITO[3], Akihito ISHIGAMI[1] ([1]TMIG, [2]TMDU, [3]Calbee Inc.)

＜背景・目的＞
日本では、高齢者の人口比率が高まるなか、ロコモティブシンドローム、サルコペニアが社会的な問題になっている。これらの問題は、高齢者の筋力低下が主要な原因であり、普段からの食事でタンパク質を多く摂取することが筋力維持に繋がると期待される。そこで、本研究では、タンパク質の摂取割合が骨格筋の再生に及ぼす影響を東京都健康長寿医療センター研究所動物室において飼育した中高齢マウスを用いて調べた。
＜方法＞
16 ヶ月齢の雄性 C57BL/6N マウスにタンパク質が 7 % (P7)、14 % (P14)、32 % (P32) 含有する飼料を与えた。4 ヶ月間飼育後、前脛骨筋に蛇毒カルディオトキシン (CTX) を投与し、筋損傷を与えた。対照として、反対の足には、生理食塩水を投与した。CTX 投与 5 日目に前脛骨筋を採取し、凍結切片を作製した。筋再生は、凍結切片をヘマトキシリン・エオジン染色後、中心核を持つ筋繊維の数と断面積を計測し、評価した。筋サテライト細胞に特異的に発現する Paired box 7 (Pax7) の mRNA 量は、定量的 PCR により測定した。また、筋サテライト細胞数は、抗 Pax7 抗体を用いた蛍光免疫組織染色法により、陽性細胞数を測定した。
＜結果＞
CTX 投与した P32 群のマウス前脛骨筋重量は、P7 群に比べて、1.2 倍、高値であった。中心核を持つ筋繊維数は、各群間で有意な差は認められなかった。しかし、P14 群および P32 群の筋線維の断面積は、P7 群に比べて、それぞれ 1.7 倍、1.9 倍、大きかった。また、P32 群の Pax7 mRNA 量と Pax7 陽性細胞数は、P7 群に比べて、それぞれ 1.4 倍、2.1 倍、高値であった。一方、生理食塩水を投与した前脛骨筋には、筋損傷と筋再生は認められなかった。
＜考察＞
タンパク質の摂取割合が多い中高齢マウスは、筋損傷による筋再生がはやいことが示唆された。

Aging, Skeletal muscle, Regeneration

講演番号：3B09a09
講演日時：3 月 19 日 11:30～ B 校舎 09 会場

タンパク質合成制限による細胞老化制御機構の解析
Regulation mechanism of cellular senescence by restriction of protein synthesis
○高氏 裕貴[1,2]、圓 敦貴[1]、三木 健輔[1,2]、鮎沢 大[1,2]、藤井 道彦[1] ([1]横浜市大生命ナノ、[2]イチバンライフ（株））
○ Yuki TAKAUJI[1,2], Atsuki EN[1], Kensuke MIKI[1,2], Dai AYUSAWA[1,2], Michihiko FUJII[1] ([1]Yokohama City Univ., [2]ICHIBAN LIFE Corp.)

細胞老化は細胞が種々のストレスに曝されるとダメージを蓄積し、分裂能力を喪失する現象で、個体老化の一因となる。したがって、細胞老化制御機構の解明および細胞老化の防止は人々の健康長寿に有用である。我々は、これまでに情報伝達経路（MAP キナーゼ）の遮断やがん抑制遺伝子（p53、RB）の不活性化などで細胞老化を抑制できることを示してきた。

細胞系や老化誘導系によって老化細胞の形質は多様であるが、DNA 複製の遅滞と細胞膨張は共通して観察される。我々は、老化細胞では増殖細胞と比較して DNA 量に変化はないが、RNA 量とタンパク質量は数倍に増加していることを見出し、このような高分子の不均衡で細胞内に高分子が過剰に蓄積することによって細胞膨張・核膨張が引き起こされ、細胞老化が起こると考えた。そして、我々は、タンパク質合成阻害剤を用い、細胞質での全タンパク質の部分的な合成制限が細胞老化および個体老化を抑制することを明らかにした。また、ERK1/2 阻害剤および抗酸化剤をタンパク質合成阻害剤と組み合わせることで、より効果的に細胞老化を抑制できることを見出した。これらの研究から、タンパク質合成が中心となって、ERK シグナル、活性酸素種と相互に関係しあい細胞老化誘導に寄与していることも明らかになったので報告する。

cellular senescence, protein synthesis, ERK

発表責任者：高氏裕貴（takauji@yokohama-cu.ac.jp）

講演番号：3B09a10
講演日時：3 月 19 日 11:45～ B 校舎 09 会場

# 初代培養アストロサイトにおける味噌抽出物の BDNF 産生促進効果

# Japanese fermented soybean paste promotes BDNF expression in primary cultured astrocyte

○有村 美紗[1]、三谷 塁一[2]、片山 茂[1]、中村 宗一郎[1] ([1]信州大農、[2]信州大先鋭領域融合)
○MISA ARIMURA[1], TAKAKAZU MITANI[2], SHIGERU KATAYAMA[1], SOICHIRO NAKAMURA[1]
([1]Shinshu Univ., [2]Shinshu Univ. ICCER)

【目的】近年，認知症をはじめとする神経変性疾患の患者数の増加が深刻な問題になっている。神経変性疾患は主に脳や脊髄といった中枢神経系に発症し，特定の神経細胞群が徐々に障害を受け減少することが知られている。日本が世界有数の長寿国である要因の一つとして日本の食文化および食生活が注目されており，近年，日本食の栄養面や機能面が見直されている。我々はこれまで，老化促進モデルマウス SAMP8 に大豆ペプチドを長期摂取させると，空間認知記憶学習能力が向上することを報告した。さらに，初代培養アストロサイトを用いた細胞実験により，大豆ペプチド中の塩基性低分子ペプチドが優れた BDNF（Brain-derived neurotrophic factor，脳由来神経栄養因子）発現促進効果を有することを見出している。そこで本研究では，日本の伝統的な発酵食品である味噌の新たな機能性の探索を目的として，味噌抽出物の BDNF 発現促進効果を検討した。
【方法】発酵前および発酵 6 ヵ月，2 年，3 年後の味噌（株式会社竹屋より恵与）を実験試料として使
用した。味噌試料を純水で溶き，95℃で 5 分間熱処理してプロテアーゼを失活させた後，凍結乾燥した。得られた粉末を冷アセトンに溶かして一晩撹拌した後，遠心分離により得た沈殿に 80 %冷エタノールを加えて 4℃下で一晩撹拌した。その後遠心分離により上清を回収し，エバポレーターでエタノールを除去した後，凍結乾燥により得た粉末を抽出物として使用した。イオン交換クロマトグラフィー，またはゲルろ過クロマトグラフィーを用いて抽出物を分画した。タンパク質濃度を BCA 法，糖濃度をフェノール硫酸法により測定した。マウス胎児脳由来初代培養アストロサイトに供試試料を添加し，6 時間後に BDNF の遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法により定量した。
【結果及び考察】初代培養アストロサイトにおいて，2 年発酵の味噌抽出物で BDNF 発現量が顕著に増加した。発酵前の味噌原料から得た抽出物，および 3 年発酵の味噌抽出物でも増加傾向は認められたが，6 ヶ月発酵の味噌では大きな変化は認められなかった。分取した塩基性画分においては，いずれの試料においても発現量の変化が見られなかった。ゲルろ過クロマトグラフィーの結果，味噌試料は味噌原料で見られた Void に認められた画分が消失する一方，2 年発酵の味噌抽出物では，糖とタンパク質を含有する画分，すなわちメイラード反応生成物であるメラノイジンの増加が認められた。
以上の結果から，初代培養アストロサイトにおいて 2 年発酵の味噌抽出物の BDNF 産生促進効果が認められたが，この効果には塩基性ペプチドではなくメラノイジンが関与していることが示唆された。

BDNF, astrocyte, miso

講演番号：3B09p01
講演日時：3 月 19 日 14:00～ B 校舎 09 会場

スクロースの高温加熱によって生成するポリフェノールーHHQ より疎水性のポリフェノールの同定ー
Identification of more hydrophobic polyphenols than HHQ in the high-temperature reaction products from sucrose.
○野島 祥子、亀田 和美、増田 俊哉（大阪市大院生活）
○Shoko NOJIMA, Kazumi KAMEDA, Toshiya MASUDA (Osaka City Univ.)

【研究目的】

ポリフェノールは，主に高等植物が生産できる物質であり，その供給量と構造の多様性は，そのポリフェノール産生植物の規制を受ける。ところで，基本的なポリフェノールの化学構造は，六炭素環のベンゼン環に複数の水酸基を有するものであり，グルコースなどの六炭糖と類似性がある。すなわち六炭糖に脱水と環の再形成反応がおきれば，ポリフェノールの基本骨格ができる。加えて，さらに分子間の複合反応がおきれば，様々な構造のポリフェノールを作り出せる可能性がある。ところで，昨年度の本大会で，食品において普遍的に存在する安価な糖質であるスクロースを原料に，pH を弱酸性に調整した加熱反応により，ポリフェノールの 1 種であるヒドロキシヒドロキノン（HHQ）が生成することを報告した [1)]。今回の研究では，このスクロース加熱反応物に，HHQ 以外のポリフェノールが生成しているか，より疎水性の高い部分について検討を加えることにした。

【方法と結果】

前回同様，スクロースの pH 6.5 リン酸緩衝液溶液を加圧下 160 ºC で加熱したものを HPLC 分析した。その結果，非常に複雑な混合物ピークを示した高保持時間帯の中に，DPPH と反応性を有し，かつ 280 nm 以上に極大吸収を有することから，ポリフェノール類の可能性のある物質ピークを複数検出することができた。しかしながら，それらは，HMF 等の既存の加熱反応生成物と比べると微量であり，構造を確認するには大量反応が必要となった。水溶媒 160 ºC 加熱法では処理量の限界があるため，水をエチレングリコールに変え，pH 6.5 の緩衝塩存在下 160 ºC での加熱反応を行った。その結果，水溶液加熱とほぼ同様な生成物を確認できた。続いて，本法でスクロースを大量加熱処理し，水ー酢酸エチル分画によりエチレングリコールを除去後，酢酸エチル可溶部を ODS またはシリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび HPLC 分取に供し，該当ピーク物質の単離，ならびに NMR 等による構造確認を進めた。これまでのところ，ポリフェノール性の物質として 3,4-Dihydroxybenzaldehyde，3,4-Dihydroxyacetophenone を確認した。現在，他の物質についても単離，構造解析実験を行っており，その結果と併せて報告する。

1）野島―日本農芸化学会 2016 年度大会講演要旨集 p 1043

Polyphenol, Sucrose, Caramelization

講演番号：3B09p02
講演日時：3 月 19 日 14:15～ B 校舎 09 会場

# 焼き調理によるナスのポリフェノール抽出量変化と重量変化の相関性

# The correlation between change of mass and polyphenol in cooked eggplant

○内田 健太郎[1]、ズエブ ニキタ[2]、竹森 利和[1] ([1]大阪ガス、[2]ブリティッシュコロンビア大)
○Kentaro UCHIDA[1], Nikita ZOUEV[2], Toshikazu TAKEMORI[1] ([1]Osaka Gas Co., Ltd., [2]Univ. of British Columbia)

【背景・目的】
ナスを焼き調理することで、ファイトケミカルであるポリフェノール類の抽出量が減少・増加することが見出されており、その増加の要因が、細胞壁の構造変化であることが示唆されている[1]。この示唆より、焼き中の細胞壁の構造変化が、重量の変化を伴い、重量変化とサンプルからのポリフェノール抽出量に相関があるという仮説を立てた。本研究では、この仮説の確からしさについて明らかにすることを目的としている。

【実験手法】
スーパーで購入した大阪府産ナスを使用し、皮を除いたナスの実部分について、ナスの軸方向に直径 32 mm、高さ 20 mm にナスの実の部分をくり抜き円柱形状のサンプルとした。また、1 辺が 21 mm の立方体形状、3 辺がそれぞれ 28 mm, 28 mm, 21 mm の直方体形状、また、直径 60 mm、高さ 20 mm の皮つきの円柱形状のサンプルをそれぞれ用意した。ガスグリル庫内の網中心部にサンプルを設置し、φ0.5 の熱電対をサンプルの中心部に差し込み、測定される温度をサンプル中心温度とした。中心温度 75, 85, 95℃のそれぞれの条件で加熱を終了した後に、速やかに液体窒素を用いてサンプルを凍結させた。凍結させたサンプルについて、凍結乾燥により水分除去を行い、乾燥後にミルサーで 1 分間粉砕した。粉末 0.10 g を使用し 80%エタノールで抽出を行い、総ポリフェノール量 (TPC)をそれぞれ測定した。それぞれの総ポリフェノール量について、サンプルからのポリフェノール抽出量を計算し、焼き中の重量変化との相関を確認した。

【結果・考察】
全てのサンプル形状における、ナスのサンプルからのポリフェノール抽出量と重量変化の関係を Fig.1 に示す。これら二つの間には、高い相関性($R^2$ = 0.9443)が見出された。この結果より、焼きサンプルからのポリフェノール抽出量は、焼きによる細胞構造の変化と、それに伴う水分の蒸発に関係することが示唆された。

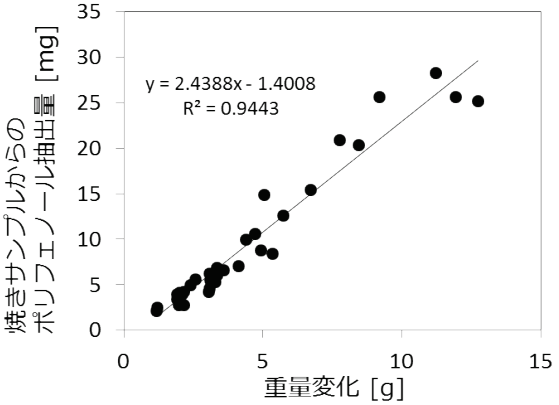


Fig.1 焼き調理による重量変化とポリフェノール抽出量の相関

【参考文献】[1]内田ら, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 大会講演要旨集, P585

polyphenol, baking, eggplant

発表責任者：内田　健太郎（ke-uchida@osakagas.co.jp）

講演番号：3B09p03
講演日時：3 月 19 日 14:30～ B 校舎 09 会場

# ポリフェノールおよびシステイン類によるカツオ肉の鮮赤色の維持研究

# Preservation of fresh red color of skipjack tuna meat by using polyphenols and cysteines

○冨重 蓮華、本田 沙理、増田 俊哉（大阪市大院生活）
○Hasuka TOMISHIGE, Sari HONDA, Toshiya MASUDA (Osaka City Univ.)

【目的】ポリフェノールは植物資源に広く存在し，様々な食品機能が期待される物質である。ところで食肉は，オキシミオグロビン($MbO_2$) が存在することで鮮赤色を示す。しかし，酸化がさらに進むとメトミオグロビン(MetMb) となり褐変化して商品価値を失うことから，$MbO_2$ を保持し，鮮赤色を維持することは重要である。我々は，システイン共存下でポリフェノールが，効率的に MetMb をオキシ化し，それを維持することを見いだした。しかしながら，このポリフェノールの機能は試験管内における比較的純度の高いミオグロビン(Mb) に対するものであるため，実際の畜肉や魚肉（赤身）において確認する必要がある。そこで，本研究では Mb のオキシ化作用を示したシステイン類共存下でのポリフェノールによって実際の食肉の鮮赤色の維持が可能かを検討することにした。
【方法と結果】一般に，畜肉より赤身の魚肉の方が変色は速く，中でもカツオは，同様な赤身を有するマグロに比べてその変色は速いとされている。従って，カツオ肉で鮮赤色の維持ができれば，その他の食肉でも十分に効果を得られるであろうと考えた。カツオの赤身肉を Bao ら[1)]の方法に準じて，ペースト状にし，ポリフェノールとしてヒドロキシチロソール(HT)，システインとして N-アセチルシステイン(NAC)，その 1:1 混合物(HT+NAC) および対象物質としてアスコルビン酸(VC) をそれぞれ 500 ppm 添加後，混和して，冷蔵（5~7 ℃）した。1 日ごとに，この食肉ペースト表面をデジタルカメラで撮影し，画像解析して変色の程度を評価した。また，ペーストを一部採取し，Mb を抽出後，抽出液の 400～700 nm の吸収スペクトルを測定することにより，Mb の酸化還元状態を推定した。結果，何も加えなかった系と NAC 系は 1 日目ですぐに肉の色が変色したが，HT 系は 2 日目まで鮮赤色を維持し, HT+NAC 系は3 日目まで鮮赤色が変化せず, VC 添加系と同程度の変色抑制能を示した。一方，吸収スペクトル測定の結果では，541 nm と 557 nm の $MbO_2$ 由来の吸収の強度の減少が，HT, HT+NAC 系と VC 添加系では，何も加えなかった系と比べると遅かった。また，4 日目の各実験系の両吸光度を比較したところ, 何も加えなかった系に対し， NAC 系では差がなかったが, HT, HT+NAC 系では，有意に吸光度が高く，また HT+NAC 系と HT 系間でも有意な差が認められ，完全に変色を防ぐことはできなかったが，HT+NAC 系の変色抑制効果が実際のカツオ肉でも確認された。

１）H. N. D. Bao, H. Ushio, T. Ohshima, *J. Agric. Food. Chem*. **2008**, 56, 10032.

Myoglobin, Fish meat, Polyphenol

講演番号：3B09p04
講演日時：3 月 19 日 14:45～ B 校舎 09 会場

セサモールを用いたアフィニティークロマトグラフィーの作成と S2 細胞由来タンパク質の精製
Sesamol immobilized affinity chromatography and purification of S2 cell protein
○玉巻 沙季子、工藤 絵美、勝崎 裕隆（三重大院・生資）
○Sakiko TAMAMAKI, Emi KUDO, Hirotaka KATSUZAKI (Mie Univ.)

【背景・目的】
ゴマ種子に含まれるリグナン類は、様々な生物機能を示すことで非常に注目されている。この生物機能に関連するタンパク質を網羅的に解析するために、アフィニティークロマトグラフィーを用いて相互作用分子の探索を行うこととし、その構築を進めている。その際、オキシラン基で活性化させる方法を使用した。構築の前段階として、リグナンの部分構造であるセサモールをゲルに固定化させることを試みた。さらに本研究では、実際にショウジョウバエ胚細胞（S2）由来タンパク質を供し、タンパク質の精製を行うことを目的とした。
【方法・結果】
Sepharose 6B 1 g と 1,4-ビス-(-2,3-エポキシプロポキシ-)ブタン 1 mL（5.5 mmol）をアルカリ条件下で 8 時間、室温で反応させた。この反応で得られた Epoxy-activated Sepharose 6B とセサモール 100 mg（0.72 mmol）をアルカリ条件下で 16 時間、室温で反応させた。反応後、反応物を水と 0.1 M $NaHCO_3$ と 0.1 M $CH_3COOH$ で洗浄した。反応物を洗った水と反応液を逆相 HPLC で分析したところ、反応前と比べて原料であるセサモールが減少したため、セサモールは Epoxy-activated Sepharose 6B に固定化されたと推測した。セサモールを固定化したゲルはモノエタノールアミンで活性基をブロックした。また比較対象として、フェノール 67.8 mg(0.72 mol)を同様にアルカリ条件下で 16 時間、室温で Epoxy-activated Sepharose 6B と反応させた。反応後、反応物を水と 0.1 M $NaHCO_3$ と 0.1 M $CH_3COOH$ で洗浄した。反応物を洗った水と反応液を逆相 HPLC で分析したところ、反応前と比べて原料であるフェノールが減少したため、フェノールは Epoxy-activated Sepharose 6B に固定化されたと推測した。フェノールを固定化したゲルはモノエタノールアミンで活性基をブロックした。
10 μM のセサモール存在下で培養した S2 細胞からタンパク質を抽出し、セサモールを固定化したゲルに供した。20 mM リン酸緩衝液、1 M NaCl を含む 20 mM リン酸緩衝液、2 M NaCl を含む 20 mM リン酸緩衝液で順次溶出させた。溶出液の SDS-PAGE 分析を行ったところ、2 M NaCl を含む 20 mM リン酸緩衝液で溶出した画分に分子量が約 66400 のバンドが見られた。

sesame, lignan, affinity chromatography

講演番号：3B09p05
講演日時：3 月 19 日 15:00～ B 校舎 09 会場

*Lactobacillus gasseri* SBT2055 の細胞ストレス抵抗性に対する影響
The effects of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 on lifespan and stress resistance.
○中川 久子[1]、小畠 英史[2]、松原 由美[1]、宮崎 忠昭[1]([1]北大遺、[2]雪印メグミルク（株））
○HISAKO NAKAGAWA[1], EIJI KOBATAKE[2], YUMI MATSUBARA[1], TADAAKI MIYAZAKI[1]
([1]Hokkaido Univ., [2]Megmilk Snow Brand Co., Ltd)

[目的] *Lactobacillus gasseri* SBT2055 (LG2055)は、整腸作用、免疫機能活性化や内臓脂肪蓄積抑制作用などを示すことが報告されており、感染症や免疫疾患などの疾病予防への応用利用が期待されている。これまでに我々は、LG2055 を摂取させると線虫 *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*)の寿命が延長すること、抗酸化ストレス関連遺伝子の発現が亢進し、老化速度が遅延することを報告した。本検討ではストレス応答に関わるミトコンドリアと小胞体に対する LG2055 の作用を *C. elegans* および哺乳類細胞を用いて検証した。

[方法] 野生型 *C. elegans* を用いて、小胞体ストレス負荷下における LG2055 の寿命への影響を調べた。タプシガルギンを小胞体ストレス源として作用させ、成虫期より OP50 (大腸菌)を摂取させた群と LG2055 を摂取させた群の生存率を比較した。また加齢に伴う小胞体ストレス応答への影響を検討する為、各菌摂取後 10 日目の線虫を用いて、ミトコンドリア関連遺伝子および小胞体ストレス応答遺伝子の発現を解析した。同様の方法でマウス細胞でも LG2055 添加群と非添加群における各遺伝子発現の変化を比較した。*C. elegans* およびマウス細胞のミトコンドリアおよび小胞体は、Mito tracker と ER tracker を用いて染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて画像を解析し、蛍光強度を比較した。

[結果と考察] 小胞体ストレス負荷時の線虫の生存率は LG2055 摂取群において有意に上昇していた。また、ミトコンドリア関連遺伝子および小胞体ストレス応答関連遺伝子の発現量は加齢に伴い低下したが、LG2055 を摂取した線虫では、この低下率が減少していた。これらの結果より、LG2055 の摂取は *C. elegans* の酸化ストレス抵抗性を亢進させるだけでなく、小胞体ストレス応答機能を増強することが想定された。さらにミトコンドリアおよび小胞体の機能への影響を調べた結果、LG2055 摂取群の線虫及び LG2055 を添加したマウス細胞では、コントロール群に比べミトコンドリア量が増加し、ミトコンドリア膜電位の上昇と ATP 産生量の増加が認められた。小胞体の構造については、タプシガルギンによりカルシウムの取り込みが阻害されると小胞体膜由来の球状構造を示すことが確認された。一方 LG2055 添加群ではこの小胞体ストレス特異的な構造体数は減少した。以上の結果から、LG2055 はストレス応答能を増強し、細胞の小胞体ダメージを減弱させること、およびストレス負荷時の線虫の寿命を延長させることが示された。

*Lactobacillus gasseri* SBT2055, *Caenorhabditis elegans*, Stress resistance

講演番号：3B09p06
講演日時：3 月 19 日 15:25～ B 校舎 09 会場

# パン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* が産生する betanin 分解抑制物質のシリカゲル TLC 板を用いた評価および探索

# Evaluation of, and searching for a betanin degradation-preventing compound produced by *Saccharomyces cerevisiae*, using silica gel TLC plate

○浅野 純一、橋床 泰之（北大院農）
○Junichi Asano, Yasuyuki Hashidoko (Hokkaido Univ.)

研究背景）アカビート塊根などに含まれる水溶性赤色色素 betanin には，アントシアニンやアスコルビン酸よりも強い抗酸化作用が認められている。しかしながら betanin は，その精製後の保存が困難なため，アントシアニンのような健康食品素材としての利用はほとんどない。我々は，betanin 含有寒天片のみを与えて飼育したワラジムシ(*Porcellio scaber*) 個体の中腸真菌叢を DGGE 法により解析した結果，betanin 摂取によって個体中腸内で酵母型真菌 *Trichosporon* sp. が優勢になることを示してきた。その中腸から分離した *Trichosporon* sp. に betanin を与え，その betanin 代謝分解能をみようとしたところ，予想に反して *Trichosporon* sp. は betanin を代謝しないばかりか，培地中の betanin 色素の自動酸化による退色・劣化を強く阻害した。そのため，同じく真菌酵母であるパン酵母 *S. serevisiae* についても同様に betanin 含有培地で培養し，退色遅延速度を比較するとともに，betanin を安定化させる抗酸化性二次代謝産物の探索を試みた。その際，betanin 退色阻害活性を酵母二次代謝産物について検定するため，シリカゲル TLC を用いた簡易アッセイ法の開発を行った。

方法・結果及び考察） 0.2% sucrose，0.5% EtOH，100 μM betanin 入り寒天片を 2 週間与えたワラジムシ個体の中腸から分離した *Trichosporon* sp. は，PCR で ITS 領域塩基配列を増幅し，相同性検索によって同定した。比較のため，*S. serevisiae* NBRC0244 株を同培地に接種・培養した。betanin 代謝試験に用いた 100 μM betanin 添加 0.2% sucrose，0.3%ジェランガム・ソフトゲル培地（18 cm 試験管に 10 mL）に，各菌株を接種後，10 秒程度ボルテックスにかけ，25℃，暗所で静置培養した。培地のみの対照区では 20 日目に betanin が退色し始めたのに対し，各酵母培養区では 50 日目を経過しても betanin の分解・退色は全く観察されず，100 日目には *S. serevisiae* 培養区で betanin 退色抑制が特に顕著であった。*S. serevisiae* ではトレハロースなどの高極性抗酸化物質の産生が報告されていることから，そのような betanin 色素退色阻害活性を示す二次代謝産物の探索を行うため，短期間で評価できるアッセイ系の構築を試み，シリカゲル TLC に活性画分をチャージし，そこに 99.7%酢酸に溶解した betanin 溶液を均一に噴霧し，24 h 目から退色し始める TLC プレートのバックグランドに対し，赤色が維持される画分を判定する方法を確立した。精製した betanin を呈色剤に用いる簡易 betanin 分解抑制試験によって,培地では 50 日を要する現象をわずか 1～3 日で評価できるようになったため，このアッセイ法を用いて，現在，*S. serevisiae* 培養液中に betanin 色素退色阻害活性因子を探索している。

betanin, antioxidant activity, *Saccharomyces cerevisiae*

発表責任者：浅野純一（asano.seitai.osei@gmail.com）

講演番号：3B09p07
講演日時：3 月 19 日 15:40～ B 校舎 09 会場

タンパク質に生成する架橋型メイラード反応後期段階生成物の分析
Analysis of the cross-linked advanced glycation endproducts formed in proteins.
○岡部 脩平[1]、臼井 照幸[2]、渡辺 寛人[1]、早瀬 文孝[1] ([1]明治大農、[2]女子栄養大栄養)
○Shuhei OKABE[1], Teruyuki USUI[2], Hirohito WATANABE[1], Fumitaka HAYASE[1] ([1]Meiji Univ., [2]Kagawa Nutrition Univ.)

【目的】メイラード反応とは、タンパク質などのアミノ化合物と還元糖などのカルボニル化合物による非酵素的な反応であり、反応の最終段階ではメイラード反応後期段階生成物（Advanced Glycation end Products:AGEs）と呼ばれる化合物群が生成する。架橋型 AGEs の一種である Glyoxal-Derived-Imidazoline-Cross-link（GODIC）は、糖由来のα-ジカルボニル化合物である glyoxal (GO) と Lys、Arg の反応により生成する架橋型 AGEs であり、Lys 側鎖と Arg 側鎖をイミダゾール環により架橋した構造を持つ。本研究では、GODIC の生成経路の解明、およびタンパク質中に生成する分子間架橋型 GODIC の分析を試みた。

【実験方法および結果】GO と $N^{\alpha}$-acetyl-L-arginine の反応溶液中からイミダゾリノン化合物 (G-H1) を逆相 HPLC により単離し、さらに $N^{\alpha}$-acetyl-L-lysine と反応させた。反応溶液を LC-ESI-Q-TOF-MS により分析したところ、GODIC の生成が確認された。そこでリボヌクレアーゼ A（RNase A）と GO の反応により、RNase A の Arg 残基に G-H1 を生成させ、さらに Lys アナログである 6-アミノヘキサン酸（EAHA）を反応させることで、タンパク質中 Arg 残基と EAHA の EAHA 分子間架橋型 GODIC の分析を試みた。反応後のタンパク質を酵素加水分解に供して LC-ESI-Q-TOF-MS により分析したところ、タンパク質中における EAHA 分子間架橋型 GODIC の経時的な増加が認められた。また、反応後のタンパク質をトリプシン消化後に LTQ-Orbitrap による LC-MS/MS に供し、EAHA 分子間架橋型 GODIC の修飾部位の解析を行った。EAHA との反応前に G-H1 による修飾が認められた部位は R10, 39, 85 であったが、EAHA との反応に伴って R39、85 の EAHA 分子間架橋型 GODIC の生成が認められ、タンパク質の修飾部位における分子間架橋形成の選択性の一部が明らかとなった。また、RNase A を、α-amylase と GO の反応生成物と反応させ、SDS-PAGE に供したところ、RNase A とα-amylase が重合したヘテロダイマーと考えられる新奇のバンドが出現した。このバンドを単離、トリプシン消化後に LTQ-Orbitrap による LC-MS/MS 分析に供したところ、GODIC が RNase A とα-amylase 分子間を架橋したペプチドが検出された。この結果より、GODIC は RNase とα-amylase を架橋することでヘテロダイマーを形成することが明らかとなった。

advanced glycation endproducts, cross-linked AGEs, glyoxal

講演番号：3B09p08
講演日時：3 月 19 日 15:55～ B 校舎 09 会場

# アシュワガンダの機能性成分ウィザノライド類に着目した研究（第 1 報）機能性成分を増加させる栽培条件の検討

# Study focused on withanolides as functional components in ashwadandha. 1. Investigation of the growth condition for increasing functional components

○和田 光生[1]、田村 和也[2]（[1]大阪府立大学、[2]ダイダン（株））
○Teruo WADA[1], Kazuya TAMURA[2]（[1]Osaka Pref. Univ., [2]Daidan Co., Ltd.）

【目的】 アシュワガンダ（*Withania somnifera*）は、インドの伝統療法であるアーユルベーダで用いられている薬草であり、元来、根の乾燥粉末が薬用として利用されてきたが、近年、葉にも有効成分が含まれており、腫瘍細胞縮小作用のほか、細胞寿命延長作用、UV ストレス低減作用などが報告されている。演者らはこれまでに、人工光型植物工場での新規機能性野菜の一つとして栽培することを目指し，最適栽培環境について明らかにするとともに、その機能性成分であるウィザノン（WN）およびウィザフェリン A（WA）が根よりも葉に高含有されていることなどを報告してきた。本報では、これらの含量を増加させる栽培技術について検討した結果を報告する。

【方法】 材料として大阪府立大学で保有する系統を用い、実験は人工気象室内で行った。水耕育苗した苗を培養液を 6 L 入れた湛液型水耕装置に 4 株ずつ定植した。基本培養液には園試処方を用いた。

実験 1：気温 27℃一定、栽培パネル面での PPFD 180 μmol $m^{-2}$ $s^{-1}$、$CO_2$ 濃度なりゆきとし、培養液の処理として、水栽培区、高濃度培養液区、NaCl 添加区、培養液に通気しない無通気区、光の処理として、赤色 LED 区、暗黒処理区およびハウス内で水耕栽培する区を設けて 1 週間処理した。

実験 2：気温 27／22℃（明／暗期）、栽培パネル面での PPFD 150 μmol $m^{-2}$ $s^{-1}$、$CO_2$ 濃度 1,000 μmol $mol^{-1}$ とし、高光強度区、暗期低気温区、高濃度培養液区、根域冷却区および高光強度赤色 LED 区を設けて 2 週間処理した。

収穫した植物は葉と茎に分けて生体重および乾物重を計測した。乾燥葉をミルで粉砕し、メタノール抽出した試料を用いて、HPLC により WN および WA の分析を行った。

【結果・考察】 実験 1：対照区の生体重あたりの WN および WA 含量はそれぞれ、22.2 および 12.2 mg/100g f.w.であった。WN 含量は高濃度培養液区と培養液無通気で高く、暗黒区および赤色 LED 区で低い傾向が見られた。WA 含量は赤色 LED 区で低い傾向が見られた。また、ハウス水耕区ではいずれの含量も乾物重あたりでは大きく低下したが、生体重あたりでは対照区と差異はなかった。

実験 2：WN 含量は対照区（29.8 mg／100g f.w.）と比較して、高濃度培養液区（55.1 mg／100g f.w.）および根域冷却区（50.8 mg／100g f.w.）で高かった。また、高光強度区でも高まる傾向が見られたが、高光強度赤色 LED 区および暗期低温区では差異は見られなかった。以上の結果から、処理期間は 1 週間よりも 2 週間の方が効果が高いこと、根域冷却と高濃度培養液の処理が WN 含量を高める効果が高いことが示された。

*Withania somnifera*, whithanone, withafelin A

発表責任者：和田光生（wadoo@bioinfo.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：3B09p09
講演日時：3 月 19 日 16:10～ B 校舎 09 会場

# アシュワガンダの機能性成分ウィザノライド類に着目した研究（第 2 報）ウィザノライド類の含有量と抗がん作用の関係

# Study focused on withanolides as functional components in ashwagandha. 2. Relation between the contents of withanolides and anticancer activity

○田村 和也[1]、和田 光生[2]、カウル スニル[3]、レヌー ワダワ[3] ([1]ダイダン株式会社、[2]大阪府大、[3]産総研)
○Kazuya Tamura[1], Teruo Wada[2], Sunil Kaul[3], Wadhwa Renu[3] ([1]Daidan Co., Ltd., [2]Osaka Pref. Univ., [3]AIST)

【目的】

アシュワガンダ（*Withania somniera*）は、インドに自生するナス科の 1 年草である。インドでは、古くから薬用として根が利用されてきた。近年、アシュワガンダに含まれる機能性成分（ステロイドラクトン類など）の効果について多数の論文が報告されている。本報では、アシュワガンダを人工光型植物工場で水耕栽培する方法を紹介する。また、ステロイドラクトン類の中でも、抗ガン作用や抗酸化作用、色素沈着抑制作用などが報告されているウィザフェリン A（WA）とウィザノン（WN）に着目して、植物の部位別（根と葉）の含有濃度を評価すると共に、水耕栽培で得られた植物（部位別）の抽出液を用いて、ガン細胞に対する毒性評価を実施した結果を報告する。

【方法・結果】

低温インキュベーター内で約 1 ヶ月栽培した苗を用意し、ロックウール粒状綿を培地とした栽培ラックに定植して栽培を行った。栽培ラック下部には、培養液のタンクとポンプがあり、定期的に上段の植物に培養液（OAT アグリオ A 処方）を供給して栽培を実施した。栽培は、光源として HEFL を用い、照明の波長や照射時間を変えて、約 2 ヶ月の栽培を実施した。

得られた植物の葉と根を部位別に乾燥・粉末化し、メタノールで抽出した後、HPLC にて WA と WN の定量評価を実施した。その結果、葉に含まれる WA と WN の濃度は、根に比べて約 10～40 倍高い結果を示しており、葉の機能性成分含有量が極めて高いことが示唆された。

また、部位別の粉末試料からそれぞれ抽出液を作製し、人のガン細胞（骨肉腫細胞 U2OS、乳ガン細胞 MCF7 等）に対する細胞毒性評価を実施した。その結果、根抽出液によるガン細胞の生存率に比べて、葉抽出液の生存率は 60 ポイント以上低い値を示した。本結果から、根抽出液に比べて葉抽出液が高い抗ガン作用を示すこと、および、機能性成分 WA と WN の含有量は抗ガン作用に強く影響していることを確認した。

Ashwagandha, Withanone, Withaferine A

発表責任者：田村和也（tamurakazuya@daidan.co.jp）

講演番号：3B09p10
講演日時：3 月 19 日 16:25～ B 校舎 09 会場

# 米ぬか成分を活用した相乗的な癌細胞増殖阻害

# Synergistic growth-inhibitory effect of cancer cells by rice bran components

○永塚 貴弘[1]、舘脇 直人[1]、西田 浩志[1]、仲川 清隆[2]、宮澤 陽夫[3,4]([1]新潟薬大・応用生命、[2]東北大院農・機能分子解析学、[3]東北大・未来科学技術共同研究センター、[4]東北大院農・食の健康科学ユニット)

○Takahiro EITSUKA[1], Naoto TATEWAKI[1], Hiroshi NISHIDA[1], Kiyotaka NAKAGAWA[2], Teruo MIYAZAWA[3,4] ([1]Niigata University of Pharmacy and Applied Life Sciences, [2]Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, [3]New Industry Creation Hatchery Center (NICHe), Tohoku University, [4]Food and Health Science Research Unit, Tohoku University)

【目的】米ぬかには不飽和ビタミン E トコトリエノール（T3）やフェルラ酸（FA）などの食品成分が豊富に含まれていることから、米ぬかの健康機能性が注目を集めている。我々は T3 の抗血管新生やテロメラーゼ阻害を報告し、T3 が高い抗癌作用を有することを明らかにしてきた[1]。T3 は 4 種の異性体の間で生理活性の強さが異なり、δ-T3 が最も高い抗癌効果を示す。T3 は通常のビタミン E であるトコフェロールと比較してバイオアベイラビリティが低いため、T3 の生理活性を相乗的に高める化合物が精力的に探索されている[2]。本研究では、米ぬか成分であるδ-T3 と FA に着目し、δ-T3 の癌細胞増殖抑制に対する FA の相乗効果を検討した。

【方法・結果】δ-T3 と FA を培地に添加して PANC-1 細胞（膵臓癌）を培養後、生存率を MTT 法で評価した。δ-T3 の単独処理により、PANC-1 細胞の増殖が濃度依存的に阻害された。一方、FA 単独では細胞の増殖に何ら影響がなかったが、δ-T3 と FA を同時に添加することでδ-T3 による増殖阻害活性が FA の濃度に依存して相乗的に高まった[3]。フローサイトメトリー解析の結果、細胞周期に対する FA の効果は認められなかったが、δ-T3 処理によって G1 期停止を誘導し、FA の同時添加でその作用が飛躍的に高まった。ウエスタンブロット法によって G1 期停止に関与する p21 の発現を調べたところ、δ-T3 と FA の同時処理で p21 の発現が効果的に増大していた。FA はフェニルプロパノイドに分類されるフェノール性化合物である。8 種のフェニルプロパノイド類縁体を用いて増殖抑制効果を同様に検討した結果、特にカフェ酸やコニフェリルアルコールはδ-T3 の効果を顕著に高めることが明らかになった。FA による相乗効果の作用機序を明らかにするために、細胞からδ-T3 を抽出して HPLC で分析した。FA を同時処理することで有意に細胞内のδ-T3 量が増大しており、FA による相乗作用はδ-T3 の細胞内濃度に起因すると考えられた。以上のことから、δ-T3 の癌細胞増殖抑制作用に対して FA は相乗効果を発揮することが明らかになり、米ぬか成分の癌予防への応用に新たな可能性を拓いた。

[1] T. Miyazawa et al., J. Nutr. Biochem., 20, 79-86 (2009)
[2] T. Eitsuka et al., Int. J. Mol. Sci., 17, E1605 (2016)
[3] T. Eitsuka et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 453, 606-611 (2014)

tocotrienol, ferulic acid, synergistic effect

講演番号：3B09p11
講演日時：3 月 19 日 16:50～ B 校舎 09 会場

# 徳島県産食用植物のガン細胞増殖抑制

Growth inhibition of cancer cells by several edible plants in Tokushima

○金丸 芳[1]、生杉 笙[2]、小山 保夫[1]、横井川 久己男[1] ([1]徳島大院生物資源、[2]徳島大院総合科学)
○Kaori KANEMARU[1], Syou IKESUGI[2], Yasuo OYAMA[1], Kumio YOKOIGAWA[1] ([1]Tokushima Univ. BBB, [2]Tokushima Univ. IAS)

【目的】今までに、食品となる植物やその由来成分についてガン細胞増殖抑制を検討してきた。香辛料の成分でもあるカフェ酸の有効性や活性に関わる構造を確認した。近年、地域の農産物の有用性やその廃棄物や未利用部位の利用が望まれている。また地域の活性化を余儀なくされており、徳島県西部の山間部に位置する那賀町も同様である。そこで、徳島県那賀町で採取した食用植物に、食品機能性としての付加価値を見出して、地域の活性化に寄与したいと考えている。今回、徳島県那賀町産の食用植物について培養ガン細胞に対する増殖抑制を検討した。

【方法】徳島県那賀町で採取した食用植物８種（ワラビ、葉ワサビ、ゼンマイ、イタドリ、スイバ、ドクダミ、クレソン、クサギ）と柑橘（柚香）の葉の計９種を用いた。乾燥後、メタノール抽出し、メタノールを除去したものを抽出物とした。メタノール抽出物を Dimethyl sulfoxide (DMSO)に溶解し、培養開始時に添加した。ガン細胞はヒト慢性骨髄性白血病細胞株 K562 とヒト大腸ガン細胞株 CACO-2 を用いた。10%FBS 添加 RPMI-1640 培地で 37℃・$CO_2$ 5%存在下で培養した。増殖の測定は MTT 法で行った。Cell Cycle は Propidium iodide(PI)による DNA 染色で検討した。Apoptosis の確認は Annexin-V-FLUOS による染色で行った。

【結果】増殖抑制は正常細胞に影響のない濃度範囲（～200μg/mL）で検討した。抽出物 100μg/mL では、K562 に対して、イタドリ、スイバ、クサギが増殖をほとんど阻止し、顕著な抑制を示した。次いで葉ワサビが増殖を 90%抑制し、強い抑制を示した。CACO-2 に対してはクサギが最も強い抑制を示し、ほとんど増殖を阻止していた。イタドリついでスイバも抑制が強く、スイバでは 80%増殖を抑制した。今回はさらに、両方の細胞に顕著な抑制を示したクサギ(*Clerodendrum trichotomum*)について検討した。双方とも濃度依存・時間依存を示した。K562 に対しては 20μg/mL で、CACO-2 に対しては 30μg/mL で 80%増殖を抑制し､それ以上の濃度では増殖を阻止していた｡Cell cycle を検討した結果、１日培養した時には、30μg/mL で、両方の細胞とも G2/M 期で Cell cycle を停止していた。さらに Apoptosis を誘導していた。クサギはシソ科の植物で、日当たりの良い山地に生息する。食用であるが、葉に特徴のある悪臭がある。そのため、湯がいて水にさらすことにより常食していた。徳島県那賀町ではクサギとジャガイモを煮た料理がある。しかし、現在ではあまり食べられていない。今回の結果より、食品機能性を提示することで、古くから地域に伝わる食材を改めて利用することに繋がると考える。

growth inhibition, cell cycle, apoptosis

発表責任者：金丸芳（kanemaru@tokushima-u.ac.jp）

講演番号：3B09p12
講演日時：3 月 19 日 17:05～ B 校舎 09 会場

ウルシを含む植物抽出物のヒト由来白血病細胞の増殖抑制およびアポトーシス誘導作用
Anti-proliferative and apoptosis inducing activity of a plant extract mixture containing *Rhus verniciflua* on human leukaemia cell

○富田 剛[1]、比留間 航[1]、門倉 一成[1]、宮田 彩香[1]、関野 由弘[1]、駿河 康平[1]、村井 妙[2]、小松 靖弘[3,4] ([1]株式会社紀文食品、[2]キンダーケア動物病院、[3]有限会社サン自然薬研究所、[4]北里大学)
○Tsuyoshi TOMITA[1], Wataru HIRUMA[1], Kazunari KADOKURA[1], Ayaka MIYATA[1], Yoshihiro SEKINO[1], Kohei SURUGA[1], Tae MURAI[2], Yasuhiro KOMATSU[3,4] ([1]KIBUN FOODS INC., [2]Kinder-Care Veterinary Clinic, [3]Sun R & D Institute for Natural Medicines Co. Inc., [4]Kitasato Univ.)

【背景・目的】
ウルシは天然塗料（漆器など）の原料として広く知られている。主成分のウルシオールはアレルギー反応を引き起こすことから、日本では食材や生薬としての利用例は少ない。一方、韓国においてウルシは、食材、生薬として広く知られており、含有する成分の同定、抗酸化活性および抗菌活性などの生理活性が報告されている。我々はウルシの食材利用を目的として、ウルシを含む植物抽出物（Rv-PEM01）を調製した。これまで Rv-PEM01 が種々の腫瘍細胞に対して増殖抑制作用を示すことを報告してきた[1)]。本研究では高い増殖抑制作用を示したヒト由来白血病細胞に対するアポトーシス誘導作用についてフローサイトメトリー、ウエスタンブロット法を用いて解析した[2)]。
【方法】
ウルシを含む 6 種類植物粉末を 70%エタノールで抽出し、ウルシオール除去および凍結乾燥した Rv-PEM01 を調製した。ヒト由来白血病細胞（MOLT-3、KG-1、K562）を Rv-PEM01 で 24 時間処理後、Annexin V、Propidium iodide で二重染色後、フローサイトメトリーにより、アポトーシス細胞を検出した。また、ヒト由来白血病細胞を Rv-PEM01 で 24 時間処理後、アポトーシス関連タンパク質である caspase-3、caspase-9、アポトーシスシグナルを受けて分解されることにより発現する cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 をウエスタンブロット法により解析した。
【結果】
フローサイトメトリー解析では、Rv-PEM01 がすべてのヒト由来白血病細胞に対して、アポトーシス誘導を起こしていることが明らかとなった。Rv-PEM01 処理することによりアポトーシス誘導された細胞の割合は、それぞれ 70.1%（MOLT-3）、34.6%（KG-1）、27.6%（K562）で細胞の種類によって感受性に違いが示された。
また、ウエスタンブロット法により、caspase-3、caspase-9 の発現量の増加は認められなかったが、アポトーシスシグナルに起因する caspase-3、caspase-9 の分解によって cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 の発現量の増加が認められた。以上の結果から、Rv-PEM01 はヒト由来白血病細胞に対してミトコンドリアを介したアポトーシスを誘導していることが示唆された。

1) Hiruma W. *et al*., *Open J. Immunol.*, **5**, 39-49 (2015).
2) Suruga K. *et al*., *Drug Res.*, (2016) in press.

Rhus verniciflua, apoptosis, anti-proliferative

発表責任者：富田剛（t_tomita@kibun.co.jp）

講演番号：3B09p13
講演日時：3 月 19 日 17:20～ B 校舎 09 会場

# がん細胞スフェロイドに対する酵素消化低分子化フコイダン抽出物の抗腫瘍効果

# Anti-tumor effects to the cancer cell spheroids by enzymatically digested low-molecular weight fucoidan extract

○徳永 佐和[1]、江藤 博[2]、白畑 實隆[3]、照屋 輝一郎[1,3] ([1]九大院シス生、[2]第一産業、[3]九大院農院)
○Sawa TOKUNAGA[1], Hiroshi ETO[2], Sanetaka SHIRAHATA[3], Kiichiro TERUYA[1,3] ([1]Grad. Sch. Sys. Life Sci., Kyushu Univ., [2]Daiichi Sangyo Co. Ltd, [3]Fac. Agr., Kyushu Univ.)

【目的】
フコイダンはコンブやモズクなどの褐藻類に多く含まれる粘性硫酸化多糖類であり、抗腫瘍効果が報告されている。現在のがん治療において、抗がん剤治療による薬剤耐性、副作用、そして治療抵抗性が問題となっており、その解決策が求められている。当研究室では、酵素消化低分子化フコイダン抽出物（LMF）がヒトがん細胞株の細胞死を誘導することを確認している。本研究は、スフェロイド培養により三次元的に培養したがん細胞に対し、医療現場で治療に用いられている抗がん剤と LMF との併用による細胞死誘導効果を確認し、より生体内に近い状態で LMF の補完代替医療への有用性の検討を目的とした。
【方法】
LMF は第一産業株式会社から提供されたトンガ王国産モズクより調製したものを使用した。抗がん剤は臨床の現場で広く使用されている 5-Fluorouracil（5-FU）と Carboplatin（CBDCA）を使用した。がん細胞を単層培養した場合とスフェロイド培養した場合において、LMF、5-FU、そして CBDCA で単独処理、または併用処理を行い、WST-1 法により細胞生存能力を評価した。また生細胞と死細胞の蛍光二重染色を行い、細胞の生死判定を行った。
【結果・考察】
がん細胞に対して LMF、5-FU、そして CBDCA による単独処理や併用処理を行ったところ、単層培養時に比べてスフェロイド培養時では各々の抗腫瘍効果の低下が確認された。しかし、抗がん剤と LMF の併用処理により、がん細胞スフェロイド培養への抗腫瘍効果の増大が確認された。また、calcein AM、ethidium homodimer-1（EthD-1)を用いたスフェロイド培養の二重染色において、抗がん剤の濃度と LMF の濃度が高いほど死細胞を示す EthD-1 の蛍光が強くなっていることが確認された。これらのことから、LMF ががん細胞スフェロイドにおいて抗がん剤の効果を高めることが示唆され、LMF 併用による抗腫瘍効果の増大と抗がん剤使用量低下による副作用軽減の可能性が考えられた。

fucoidan, anti-cancer, spheroid

講演番号：3B09p14
講演日時：3 月 19 日 17:35～ B 校舎 09 会場

酵素消化低分子化フコイダン抽出物および抗がん剤の併用による抗腫瘍効果
Anti-tumor effects of combined use of enzymatically digested low-molecular weight fucoidan extract and anti-cancer drugs

○平田 千尋[1]、江藤 博[2]、吉田 年宏[3]、白畑 實隆[4]、照屋 輝一郎[1,4]([1]九大院生資環、[2]第一産業、[3]吉田クリニック、[4]九大院農院)
○Chihiro HIRATA[1], Hiroshi ETO[2], Toshihiro YOSHIDA[3], Sanetaka SHIRAHATA[4], Kiichiro TERUYA[1,4] ([1]Grad. Sch. Bioers. Bioenv. Sci. Kyusyu Univ., [2]Daiichi Sangyo Co. Ltd, [3]Yoshida clinic, [4]Fac. Agr. Kyusyu Univ.)

【目的】
フコイダンはコンブやモズクなどの褐藻類に多く含まれる粘性硫酸化多糖類であり、様々な生理活性が報告されている。現在の抗がん剤を用いた治療では、薬剤耐性や副作用、治療抵抗性が問題となっており、その解決策が求められている。当研究室では、酵素消化低分子化フコイダン抽出物（LMF）ががん細胞株の細胞死を誘導することを確認した。本研究では、様々ながん細胞において医療現場で治療に用いられている抗がん剤と LMF との併用によるがん細胞死誘導効果を確認し、LMF の補完代替医療への有用性の検討を目的とした。
【方法】
LMF は第一産業株式会社から提供されたトンガ王国産モズクより調製したものを使用した。抗がん剤は臨床の現場で広く使用されている Carboplatin（CBDCA）を使用した。LMF または CBDCA をがん細胞および正常細胞に単独処理または併用処理を行い、細胞数および細胞生存能力を評価した。さらに複数のがん細胞を用いることで、悪性度が高いとされるがん細胞への効果を確認した。
【結果・考察】
試験した全てのがん細胞において LMF と CBDCA はそれぞれ単独処理で細胞数の低下が確認された。その効果は LMF と抗がん剤の併用処理により増強された。正常細胞における LMF 単独処理は細胞数の変化はほとんど見られず、LMF の正常細胞に対する細胞毒性は低いことが確認された。以上のことから、LMF は正常細胞に対しては影響を与えないが、がん細胞に対しては抗がん剤の抗腫瘍効果を増強させることが確認され、がん化学療法に役立つ可能性が考えられた。

fucoidan, anti-cancer

講演番号：3B09p15
講演日時：3 月 19 日 17:50～ B 校舎 09 会場

mRNA 成熟阻害活性を指標とした抗ガン活性化合物の探索
Exploring anti-cancer compounds which inhibit mRNA maturation
○森本 茉莉[1]、北野 敦子[2]、鶴岡 諒子[2]、増田 誠司[1] ([1]京大・生命、[2]京女大・家政)
○Mari MORIMOTO[1], Atsuko KITANO[2], Ryoko TSURUOKA[2], Seiji MASUDA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Women's Univ.)

日本人のがんにおける死亡率は年々増加しており、1981 年以降死亡原因の第 1 位となっている。また、日本の高齢化率も年々増加しており、平成 26 年度における日本の高齢化率は 26.0%である。がんは長い年月を経て細胞に変異が蓄積することで起きる病気であるので加齢に伴って起きやすいとされている。超高齢社会を迎えた日本にとってがん対策はとても重要であり、日常的に摂取する食品等からがんを予防できる成分を摂取することができれば健康な長寿社会の一助となる。

真核生物では核内で DNA の情報が mRNA に転写され、5'キャッピング、スプライシング、3'ポリアデニル化といった成熟過程を正常に受けた mRNA のみが細胞質へと輸送され、タンパク質へと翻訳される。近年様々な抗がん剤の作用機序が発見されているが、その一つに mRNA の成熟過程の一つであるスプライシングがあげられる。例えば SSA、GEX1A などの薬剤はスプライシングを阻害することで mRNA の成熟過程を阻害する。結果として、がん細胞の増殖を抑制することが期待されている。

本研究は、食品に由来する成分より核内の mRNA プロセシングを阻害する化合物を探索した。手法として、核内での mRNA 成熟が阻害されると mRNA は核内に蓄積することを利用して、U2OS 細胞に候補化合物を添加して mRNA の核内局在を RNA-Fluorescence *in situ* hybridization (RNA-FISH)を用いて観察した。

様々な食品成分より、核内 mRNA 成熟を阻害する成分の探索を行った。その中で、クロロゲン酸を添加すると核内での mRNA の有意な蓄積が観察できた。クロロゲン酸は、カフェ酸とキナ酸が融合した化合物であるので、カフェ酸とキナ酸について同様の実験を行った。その結果、カフェ酸にはクロロゲン酸に比べて弱い活性が観察された。一方、キナ酸について活性は認められなかった。またクロロゲン酸ラクトンの 1 つの 3CQL でもクロロゲン酸と同様に mRNA の有意な核内蓄積が観察された。現在、これらの化合物の作用機序を含めて生化学的な解析をさらに進めている。

これらの化合物はコーヒーに多く含まれている成分である。コーヒーには抗ガン活性を持つことが報告されているが、抗ガン活性の一部はこれらの化合物を通した mRNA 成熟過程の阻害により発揮されている可能性が考えられた。

mRNA processing, coffee, cancer

発表責任者：森本茉莉（morimoto.mari.44w@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3B09p16
講演日時：3 月 19 日 18:05～ B 校舎 09 会場

# CYP2E1 の遺伝子多型がニトロソアミンの代謝活性化に与える影響に関する研究

Study on effect of CYP2E1 gene polymorphisms on chemical carcinogenic pathway in foods

○藤山 友里[1]、今石 浩正[2] ([1]神大院農、[2]バイオシグナル総合研究セ)
○Yuuri TOHYAMA[1], Hiromasa IMAISHI[2] ([1]Kobe Univ., [2]Biosig. Res. Cen.)

【背景・目的】

薬物代謝酵素シトクロム P450（CYP または P450）は、生体内に取り込まれた様々な化合物を水溶性の高い代謝物へと変換することで、化合物の生体外への排出を促進する解毒酵素である。一方 P450 と一部の化合物との代謝反応により生じた活性中間体は、核酸やタンパク質との非特異的な結合を介して、変異原性やがん原性などの多様な化合物毒性を生じさせる事も知られている。最近の研究から、P450 による薬物代謝反応には個人差や人種差が存在することが明らかになってきた。これらの主要因の一つとして考えられているのが、P450 ゲノム上の一塩基多型（single nucleotide polymorphism:SNP）である。P450 の SNPs は、人種により出現頻度が異なることが報告されており、本遺伝子多型が人種間での遺伝子発現量や酵素機能の差異に影響を及ぼしていると推定されている。食肉成分由来のニトロソアミン類は、CYP2E1 により代謝活性化を受け発がん物質へと変化することが明らかになっているが、遺伝子多型による代謝能の差異に関する詳細な報告は成されていない。そこで本研究では、ニトロソアミン類の代謝活性化における、P450 の SNPs の影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】

P450 発現組換え大腸菌より膜画分を調製した。P450 代謝実験に用いた各 CYP2E1SNPs のタンパク質量は、SDS-PAGE 解析により決定した。代謝実験には、発がん性が報告されている 7 種類の食品成分（ニトロソジメチルアミン、ニトロソジエチルアミン、ニトロソジブチルアミン、ニトロソプロピルアミン、ニトロソピペリジン、ニトロソモルホリン、ニトロソピロリジン）を用いた。また、酵素活性測定は、P450 代謝の副代謝産物であるアルデヒドを 412 nm の発色法で定量することにより行った。

【結果】

CYP2E1*1 発現組換え大腸菌を作製した。次に、QuickChange II site-directed mutagenesis kit を用いることで、CYP2E1*2, *3, *4, *UN を作製した。各大腸菌の膜画分を超遠心により調製し、還元型 CO 差スペクトルを測定したところ 450nm 付近に吸収極大が確認された。次に、CYP2E1*1 による 7 種類のニトロソアミン代謝を調べた結果、ニトロソジメチルアミンが最も代謝活性が高いことが判明した。現在、各 CYP2E1SNPs を用いた 7 種類のニトロソアミン代謝活性を評価中である。

P450, Nitrosamine, cancer

発表責任者：今石浩正（himaish@kobe-u.ac.jp）

講演番号：3B10a01
講演日時：3 月 19 日 09:20～ B 校舎 10 会場

# ライチ由来低分子化ポリフェノール Oligonol の抗炎症効果

# Anti-inflammatory effect of Oligonol, oligomerized polyphenol formulated from lychee fruit polyphenol

○河合 咲紀[1]、林 洪太[1]、長田 恭一[1]、高成 準[2]、北舘 健太郎[2]([1]明治大農、[2]株式会社アミノアップ化学)
○Saki KAWAI[1], Kota HAYASHI[1], Kyochi OSADA[1], Jun TAKANARI[2], Kentaro KITADATE[2]
([1]Meiji Univ., [2]AMINO UP CHEMICAL Co.,Ltd.)

【目的】

メタボリックシンドロームの基礎病態として慢性炎症が注目されており、マクロファージをはじめとした免疫担当細胞の脂肪組織への浸潤がメタボリックシンドロームの発症と進展に深く関与している。果実や野菜の苦味成分であるポリフェノールは高い抗酸化作用を有し、その摂取がメタボリックシンドロームの予防・改善につながると考えられる。

Oligonol はライチ由来プロシアニジンを酸熱分解することで低分子化し吸収率を高めたポリフェノール素材である。我々はこれまでに、Oligonol の機能性として生体内コレステロールレベル低下作用、脂肪酸合成抑制作用、抗動脈硬化作用を報告してきた。また、Oligonol の摂取によってリン脂質膜中の脂肪酸組成に変化が見られ、抗炎症作用を示す可能性が示唆されたが、炎症反応に与える直接的影響については明らかになっていない。そこで本研究では、Oligonol の抗炎症作用について、LPS 刺激によって炎症を誘導したマクロファージ細胞を用いて検討することを目的とした。

【方法】

マウス由来マクロファージ様細胞株 J774A.1 細胞に対し、炎症誘導材として LPS(1 μg/mL)を添加し 24 時間インキュベートして炎症を誘導した。炎症誘導時、誘導前、誘導後にそれぞれ Oligonol(10-100 μg/mL)を添加し、Oligonol の抗炎症作用、炎症改善作用、炎症予防作用についての検討を行った。

【結果と考察】

LPS の添加によって培地中 NO レベルは有意に高くなり、炎症が誘導されていることを確認した。抗炎症モデルあるいは炎症改善モデルにおいては、培地中の NO レベルは 50 及び 100 μg/mL の Oligonol 添加によって LPS 添加群と比較して有意に低くなったが、10 及び 25 μg/mL の Oligonol 添加によっては高くなった。炎症予防モデルにおいては、Oligonol 添加濃度に依存して低くなった。マクロファージ細胞中の炎症性メディエーターの遺伝子発現レベルや脂肪酸組成については現在検討中である。

本研究結果から、Oligonol は炎症予防作用を有すると考えられた。しかしながら、炎症をすでに発症している場合、Oligonol の低用量の摂取は炎症を促進させてしまう可能性が示唆された。Oligonol の適切な摂取方法についてさらなる検討が必要である。

anti-inflammation, procyanidin, macrophage

講演番号：3B10a02
講演日時：3 月 19 日 09:35～ B 校舎 10 会場

野沢菜の発酵による免疫調節機能の増強と関与する乳酸菌の解析
Changes of immunomodulatory effects and the number of lactic acid bacteria during the fermentation of *Brassica rapa* L.

○濵島 知里[1]、山本 佳奈[1]、大角 友貴[1]、髙橋 楓香[1]、鈴木 弥生[1]、渡辺 純[2]、田中 沙智[1]([1]信州大農、[2]農研機構・食総研)
○ Chisato HAMAJIMA[1], Kana YAMAMOTO[1], Yuki OHGAKU[1], Fuka TAKAHASHI[1], Yayoi SUZUKI[1], Jun WATANABE[2], Sachi TANAKA[1] ([1]Shinshu Univ., [2]National Food Research Institute, NARO)

【背景・目的】近年、炎症性腸疾患やアレルギー性疾患などの免疫関連疾患の患者数が増加しているが、これらの疾患は難治性のものが多く、根治療法が確立されていないため、患者の QOL を下げる原因となっている。そのため、日々の食事で免疫調節作用を持つ食材を摂取することが疾患を予防・改善する上で有用であると考えられる。乳酸菌は多くの発酵食品に含まれ、免疫調節作用を含む様々な健康効果が知られている。当研究室ではこれまでに、長野県の伝統野菜の一種である野沢菜および野沢菜漬けが、免疫バランスを制御するサイトカインである IFN-γおよび IL-10 を産生誘導することを明らかにしてきた。しかしながら、その免疫調節作用に対する乳酸菌の関与については分かっていない。そこで本研究では、野沢菜原料を塩漬けにした野沢菜漬けを作成し、その発酵過程での免疫調節作用の変化、および単離した乳酸菌のサイトカイン産生誘導能を明らかにすることを目的とした。
【方法】野沢菜原料と食塩水（食塩は原料の 7%重量）をポリ袋に入れ、10℃で漬け込むことで野沢菜漬けを作成した。原料と漬け込み後 3、7、14、21、28 日目に各野沢菜漬けを回収し、サンプルとして用いた。乳酸菌数の測定では、サンプルに滅菌リン酸緩衝生理食塩水を加え、希釈した懸濁液を MRS 寒天培地に播種し、48 時間培養後、酸生成を示した乳酸菌コロニー数を測定した。単離した乳酸菌は MRS 液体培地中で培養し、65℃で 30 分間処理することにより加熱殺菌した。野沢菜原料と漬け物および野沢菜漬け由来乳酸菌のサイトカイン産生誘導能を調べるために、熱水抽出物および加熱殺菌した乳酸菌を C57BL/6 マウスの脾臓細胞に添加し、48 時間培養後の培養上清中に含まれる IFN-γ、IL-10 産生量を ELISA にて測定した。
【結果・考察】発酵過程での pH の変化を測定したところ、漬け込み後 7 日目以降で pH の低下が見られた。継時的な乳酸菌数の変化を調べたところ、原料にも乳酸菌は存在し、漬け込みによって乳酸菌数が増加したことから、乳酸菌による乳酸発酵が起こっていると推察できた。また、野沢菜原料と漬け物のサイトカイン産生誘導能を調べたところ、原料にも IFN-γおよび IL-10 の産生誘導能が見られたが、漬けることでその産生量が増加した。さらに、単離した全ての乳酸菌にサイトカイン産生誘導能が見られ、中でも IFN-γおよび IL-10 を高く産生誘導する乳酸菌株を取得することができた。以上の結果から、野沢菜原料の発酵による免疫調節作用の増強に乳酸菌が関与することが示唆された。今後は、単離した野沢菜漬け由来乳酸菌の菌種同定、およびマウスに摂取させた時の生体内での免疫調節作用の解析を行う予定である。

*Brassica rapa* L, Immunomodulation, Lactic acid bacteria

講演番号：3B10a03
講演日時：3 月 19 日 09:50～ B 校舎 10 会場

# 免疫調節機能に対する野沢菜漬け摂取の影響

# Immunomodulatory effects of a fermentation of *Brassica rapa* L. in healthy volunteers

○田中 沙智[1]、山本 佳奈[1]、濵島 知里[1]、鈴木 弥生[1]、寺島 真[2]、杉山 陽司[3] ([1]信州大農、[2]株式会社ワンネスサポート、[3]株式会社まるたか)
○ Sachi TANAKA[1], Kana YAMAMOTO[1], Chisato HAMAJIMA[1], Yayoi SUZUKI[1], Makoto TERASHIMA[2], Yoji SUGIYAMA[3] ([1]Shinshu Univ., [2]One ness support Inc., [3]Marutaka Inc.)

【背景と目的】免疫バランスを維持するためには、免疫機能を調節する成分を含む食材を毎日の生活の中で摂取することが簡便、且つ効果的である。我々はこれまでに、抗がん、抗感染、抗アレルギー作用において重要なサイトカインである IFN-γの産生誘導能を指標に、免疫調節作用をもつ野菜のスクリーニングを行った結果、信州の伝統野菜の一種である「野沢菜（*Brassica rapa* L.）」に非常に高い活性があることを見出した。また、野沢菜抽出物を経口摂取させたマウスの脾臓細胞において NK 活性が増加し、脾臓細胞の IFN-γ産生が増加した。しかしながら、ヒトにおいて野沢菜摂取による免疫機能の影響については分かっていない。そこで本研究では、野沢菜漬け摂取のヒト介入試験を行い、免疫機能および抗メタボリックシンドローム効果に対する影響について検討した。
【方法】被験者に対して試験内容、方法について十分な説明を行った後、インフォームド・コンセントが得られた被験者 20 名（男性 11 名、女性 9 名）を対象にヒト介入試験を行った。野沢菜漬けの摂取量は 1 日当たり 30g とし、摂取期間は 4 週間とするオープン試験を実施した。摂取前と摂取開始から 4 週間後に採血を行い、血液生化学検査を行った。また、血液より末梢血単核球を単離し、T 細胞と NK 細胞の割合をフローサイトメーターで測定した。NK 活性の測定では、ターゲット細胞として K562 を用いて $^{51}$Cr release assay 法により測定を行った。試験期間中、日誌に便回数や便形状について記載してもらい、それをもとに整腸作用への効果を検証した。統計解析は、ウィルコクソン符号付順位検定を用いて行った。
【結果】野沢菜漬けを 4 週間摂取することにより、総コレステロールと LDL コレステロールが有意に低下した。肝機能マーカーである AST（GOT）、ALT（GPT）、γ-GT の数値も、野沢菜漬け摂取で低下したことから、野沢菜漬けに抗メタボリックシンドロームとしての効果があることが示唆された。また、免疫機能に関する評価項目では、野沢菜漬けの摂取により T 細胞の割合は有意に低下したが、NK 細胞の割合は有意に増加し、NK 活性も有意に増加したことから、ヒトにおいても野沢菜漬けの摂取による免疫調節作用があることが示された。さらに、試験期間中の排便回数が増加し、便形状も改善されたことから、野沢菜漬けの摂取は整腸作用の効果があることも示唆された。以上のことから、野沢菜漬けは免疫賦活効果があり、抗メタボリックシンドローム作用を有することが示唆された。今後は、野沢菜漬けの免疫調節作用に関与する成分を特定することや、野沢菜摂取における腸内細菌への影響や免疫調節作用への関連について、詳細なメカニズムを明らかにしていきたい。

Immunomodulatory effect, *Brassica rapa* L., Clinical study

講演番号：3B10a04
講演日時：3 月 19 日 10:05～ B 校舎 10 会場

*Lactobacillus plantarum* 06CC2 摂取による免疫賦活に及ぼす影響と腸内環境に与える効果について
The Effect of Oral Administration of *Lactobacillus plantarum* 06CC2 on Immune Stimulation and Intestinal Microbiota in Humans

竹下 正彦[1]、松崎 竜也[1]、○李 怡然[1]、ツェンド - アユシュ チュルンバット[2]、オユンスレン ツェンドスレン[3]、宮原 広典[4]、上村 修司[5]（[1]南日本酪農協同、[2]蒙科技大、[3]蒙バイオ協会、[4]鹿児島県厚生連健康管理センター、[5]鹿児島大学医）
Masahiko Takeshita[1], Tatsuya Matsusaki[1], ○Yiran Li[1], Chuluunbat Tsend-Ayush[2], Tsendsuren Oyunsuren[3], Hironori Miyahara[4], Shuji Kanmura[5] ([1]Minami Nihon Rakuno Kyodo, [2]Mongolian Sci. & Technol. Univ., [3]Monglian Biotechnol. Association, [4]Kagoshima Kouseiren Med. Health Care Cent., [5]Fac. Med., Kagoshima Univ.)

**【背景と目的】**我々は今までにモンゴル伝統的乳製品より乳酸菌を約 2,000 株分離し、その中からプロバイオティクス性が期待される 20 株を選び出した[1)]。さらに、動物実験においてインフルエンザウイルス感染抑制を示し、NK 細胞を活性化する乳酸菌をスクリーニングしたところ *Lactobacillus plantarum* 06CC2（06CC2）株を見出した[2,3)]。本実験では 06CC2 株の摂取がヒトの免疫に及ぼす影響と腸内細菌叢へ与える効果について調査した。

**【方法】**60 名（Age 22-61、プラセボ群 31 名、06CC2 群 29 名）の健常者を対象に二重盲検試験を実施した。プラセボ食群には *Streptococcus thermophilus* TA-45 で作ったヨーグルトを、06CC2 群には 06CC2 で発酵したヨーグルトを 1 日 2 回（80g/回）、4 週間摂取させた。摂取前、摂取後 2 週間および 4 週間の血液と糞便を採集し、NK 細胞活性とリンパ球幼若化活性（Con-A）の測定を行い、腸内細菌叢解析については、一部（n=10）はメタゲノム解析で腸内細菌の占有率を解析し、残りは定量的 PCR 法を用いて測定した。

**【結果と考察】**06CC2 ヨーグルト摂取群の NK 細胞活性は摂取前に比べ摂取後 2 週間で有意（$p<0.05$）に上昇した。リンパ球幼若化活性は摂取前に比べ摂取後 4 週間で有意（$p<0.05$）に上昇した。腸内細菌叢については、メタゲノム解析により 06CC2 ヨーグルト摂取 4 週間で Bifidobacteriaceae 科の比率が有意に増加し、*Lactobacillus* 属は摂取後 2 週間、4 週間で摂取前に比べ有意に上昇した。さらに、*Faecalibacterium* 属は摂取 2 週間後において、06CC2 試験食群がプラセボ食群に比べ有意（$p<0.05$）に上昇した。以上の結果から、06CC2 の経口摂取により、ヒトの免疫に対して影響を与えることが確認され、さらに腸内細菌叢についても菌叢の改善が見られたことが示唆された。

1) Takeda S. et al., *J. Anim. Sci. J.*, 82, 571-579 (2011)
2) Takeda S. et al., *Int. Immunopharmacol.*, 11, 1976-1983 (2011)
3) Takeda S. et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77, 1372-1378 (2013)

lactic acid bacteria, immune stimulation, intestinal microbiota

発表責任者：竹下　正彦（m-takeshita@dairy-milk.co.jp）

講演番号：3B10a05
講演日時：3 月 19 日 10:20～ B 校舎 10 会場

*Pediococcus acidilactici* K15 株のヒト末梢血由来樹状細胞に対する免疫賦活効果
*Pediococcus acidilactici* K15 activates Human Monocyte-derived Dendritic Cells.
○碇 菜穂[1]、川島 忠臣[1]、久保田 芳郎[2]、下条 直樹[3]、辻 典子[4] ([1]キッコーマン（株）研究開発本部、[2]キッコーマン（株）キッコーマン総合病院、[3]千葉大院 医学研究院 小児病態学、[4]産総研 バイオメディカル研究部門)
○Naho IKARI[1], Tadaomi KAWASHIMA[1], Yoshiro KUBOTA[2], Naoki SHIMOJO[3], Noriko M TSUJI[4] ([1]Kikkoman Corp., [2]Kikkoman General Hospital, [3]Chiba Univ., [4]AIST)

【背景】
我々はこれまでに、乳酸菌の菌体内 2 本鎖 RNA（dsRNA）により誘導される IFN-βが抗炎症作用に関わっていることを確認してきた（Kawashima T *et al*, *Immunity.* 2013 Jun 27;38(6):1187-97.）。ぬか床由来乳酸菌 *Pediococcus acidilactici* K15 株（以下、K15）は高い IFN-β誘導能を有していることを確認しており、今回ヒト単球由来樹状細胞（monocyte-derived dendritic cell : moDC）を用い、K15 により誘導される IFN-βが各種サイトカイン産生に及ぼす影響を評価した。

【方法】
被験者より採取した血液から末梢血細胞を単離し、その後 CD14 陽性細胞を分離した。CD14 陽性細胞を GM-CSF、IL-4 存在下で 7 日間培養し、moDC を得た。この moDC と乳酸菌 K15 を共培養し、培養上清、total RNA を回収した。培養上清は ELISA 法により各種サイトカイン濃度を測定した。total RNA については定量的 RT-PCR により各種サイトカイン、IFN の mRNA 発現量を解析した。また、共培養時に抗 IFN-β中和抗体を添加することで、moDC から産生される IFN-βの影響も調べた。RNase A で処理した K15 菌体を用い、菌体内 RNA が各種サイトカイン産生に及ぼす影響についても評価した。

【結果と考察】
moDC を K15 で刺激することにより IL-12 産生が誘導された。また、その効果は抗 IFN-β中和抗体を添加することで減弱することを確認した。このことから、K15 による IL-12 産生誘導は、IFN-β産生を介して増強されていることが示された。さらに、RNase A 処理した K15 菌体においては IL-12 産生誘導が消失したことから、K15 の菌体内 RNA が IL-12 産生に関与することが明らかとなった。

IL-12, Lactic acid bacteria, RNA

講演番号：3B10a06
講演日時：3 月 19 日 10:45～ B 校舎 10 会場

# 免疫系の老化を定量的に評価するための指標の確立

# A novel method for evaluating the aging of murine immune systems

○小方 優弥、細井 瑳耶佳、久能 涼子、須田 瞭太、榎本 淳（群大院理工）
○Yuya OGATA, Sayaka HOSOI, Ryoko KUNO, Ryota SUDA, Atsushi ENOMOTO (Gunma Univ.)

【目的】我が国は世界に冠たる長寿国であるが、平均寿命と健康寿命の差は約 10 年もある。健康寿命を延ばすためには、高齢者の免疫力を向上させる必要があるが、免疫系の老化に関しては未知の点が多い。本研究ではマウス免疫系の老化を定量的に表すことができる指標を見出すことを目的とした。
【結果および考察】オスの NOD マウスを市販の飼料および水道水を自由摂取させることにより飼育し、1 型糖尿病未発症の 9～100 週齢のマウスを実験に用いた。これらのマウスの外見の様子を比較したが、加齢に伴い毛並みが悪くなるものの、顕著な老化の様子は認められなかった。体重に関しては 10～40 週齢の期間単調増加し、その後約 35 g ほどでほぼ一定になったのに対し、脾臓細胞数は 9 週齢から加齢に伴い徐々に減少し、100 週齢では 9 週齢のおよそ 2/3 となった。

これらのマウスの脾臓細胞を抗 CD3 抗体あるいは LPS 刺激を加えて培養し、それぞれの細胞増殖量を測定したところ、2 種類の刺激による増殖応答とも、週齢の異なるマウス間でその強さに有意な差がないことが明らかとなった。しかしこれらの脾臓細胞のサイトカイン応答に関しては、加齢に伴う明確な相違が存在した。本研究で測定した 5 種類のサイトカイン（IL-4、6、10、12、IFN-γ）の中で、抗 CD3 抗体刺激時に有意に産生が認められたのは IL-6、10、IFN-γであり、LPS 刺激時に認められたのは IL-6 および 10 であった。抗 CD3 抗体刺激により誘導されるサイトカイン応答は、すべて加齢に伴い減少傾向にあった。一方 LPS 刺激時では、炎症性サイトカインの一つである IL-6 は 9 週齢から 60 週齢まではその産生量が増加し、さらに高齢になるとその産生量は減少したが、高い値を維持した。これに対して、抗炎症性サイトカインである IL-10 は 9 週齢から加齢に伴い、その産生量が大きく単調減少した。この IL-6 と IL-10 の産生量の比を求めたところ、興味深いことに、IL-6/IL-10 値が加齢に伴い単調増加し、60～70 週齢あたりで両者の産生モル数が同程度になり（IL-6/IL-10 ≒ 1）、その後この値の高い状態が維持されることが見出された。これは加齢に伴い、NOD マウスが徐々に炎症を起こしやすい状態になり、およそ 1 年齢以降では極めて高い状態が維持され続けることを示すものであり、マウスの免疫系の老化を定量的に表す指標としてここに提案したい。
現在、長寿に有効であるとされているカロリー制限食がこの IL-6/IL-10 値に及ぼす影響を調べるために、食餌量を自由摂取群のおよそ 70 %に低減したカロリー制限食群を用意している。これらの NOD マウスの IL-6/IL-10 値がどのように変化するのかに関しても、併せて報告する予定である。

Aging, Immune system, Cytokine

発表責任者：榎本　淳（enomoto@gunma-u.ac.jp）

講演番号：3B10a07
講演日時：3 月 19 日 11:00～ B 校舎 10 会場

光センシングによる簡便な生体内抗酸化能評価システムの開発
Development of an easy-to-use optical sensing system for evaluating *in vivo* antioxidant capacity
○數村 公子[1]、土屋 広司[1]、原 顕子[1]、竹内 康造[1]、美和 登志幸[1]、服部 将貴[2]、森下 直計[3]、大澤 俊彦[4] ([1]浜松ホトニクス・中研、[2]浜松ホトニクス・開発本部、[3]浜松ホトニクス・電子管、[4]愛知学院大・心身)
○Kimiko KAZUMURA[1], Hiroshi TSUCHIYA[1], Akiko HARA[1], Kozo TAKEUCHI[1], Toshiyuki MIWA[1], Masaki HATTORI[2], Naokazu MORISHITA[3], Toshihiko OSAWA[4] ([1]Hamamatsu Photonics CRL, [2]Hamamatsu Photonics DEV, [3]Hamamatsu Photonics ETD, [4]Aichi Gakuin Univ.)

【目的】生活習慣病発症や老化促進の原因と考えられている酸化ストレスに対し、食事由来の抗酸化成分摂取による改善が期待されている。「食」を摂取した後の生体内での真の効果が判別できる簡便法として、我々は酸化ストレスの原因となる好中球の過剰活性化を光センシング技術により評価できる手法を開発し、昨年度の本学会等で、個人差や食事摂取の影響が評価できることを報告した。今回、より正確な評価を目指して新たなシステム開発に取り組んだので、その概要とデータを紹介する。
【方法・結果】好中球の活性化指標となるスーパーオキシド（$O_2^{\cdot-}$）産生とミエロペルオキシダーゼ（MPO）活性を、$O_2^{\cdot-}$検出用化学発光試薬 MCLA による化学発光と、次亜塩素酸イオン（$OCl^-$）検出用蛍光試薬 APF による蛍光の、二つの光情報に変換して検出する技術を開発した。指先からランセットを用いて自己採取した極微量の血液中の好中球活性を、細胞分離することなく希釈のみで測定可能とするために、赤血球や血液中の夾雑物による影響を最小限にした光学系としてプレパラート型試作機を先行開発した。これにより、末梢血 3μL で好中球活性の測定に成功したが、血液試料の露出による操作性の悪さ、加湿機能が必要なため装置が大がかり、撹拌渦の信号への影響等、問題が浮上した。これらの問題を解決するため、新たにディスポーザブルの樹脂製角型計測セルと計測装置を開発した。本容器は、赤血球や夾雑物による光吸収の影響を低減するため光路長２ｍｍの薄型セルとし、射出成形により製作した１組の部品を、試料への影響を考慮して接着剤を避け超音波溶着で接着している。また容器内には安価な磁性体の回転子を備えており、血液凝集抑制や刺激剤の混合を可能とした。本容器の開発により、上述した問題が全て解決できただけでなく、信号検出面積の増大により同じ血液量で 3 倍程度の高感度化が実現し、安定性、再現性が向上した。専用容器に合わせて開発した装置は、先行のプレパラート型と比較して、加湿機能が不要になったこと、エア撹拌機能をモーター式スターラーに変更したこと等により、容積比 1/2 以下、重量比 1/4 以下の大幅な小型化、軽量化が実現し、消費電力も 1/10 以下となり汎用性が向上した。また、プレパラート型と同様に 2 試料同時計測型としたため、$O_2^{\cdot-}$消去剤の SOD、MPO 阻害剤の ABAH を添加したネガティブコントロールを同時に計測でき、正確な活性評価が本試作機でも実現した。改良システムを用いて、健常者ボランティアによる生活リズムとの関連性を検討中である。本手法の概要と共に結果を報告する。
本研究は、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構、SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」委託研究で実施した。

*in vivo*, antioxidation, innate immune response

発表責任者：數村公子（kimiko-k@crl.hpk.co.jp）

講演番号：3B10a08
講演日時：3 月 19 日 11:15～ B 校舎 10 会場

マスト細胞の成熟過程における転写因子 C/EBP α の発現制御
Regulation of the C/EBPα gene expression during the terminal differentiation of mast cells
○岩月 美桜乃[1]、高橋 恭子[1]、芳賀 真矢[1]、堀 大峰[1]、笠倉 和巳[1,2]、花澤 重正[1] ([1]日大生物資源、[2]東京理科大基礎工)
○Miono Iwatsuki[1], Kyoko Takahashi[1], Maya Haga[1], Hirotaka Hori[1], Kazumi Kasakura[1,2], Shigemasa Hanazawa[1] ([1]Nihon Univ., [2]Tokyo Univ. Sci.)

【目的】近年、腸内細菌とアレルギーとの関連が注目されているが、その機構は十分明らかにされていない。ヒスタミンなどの炎症物質を含む顆粒を保持し、アレルギー炎症の誘導に鍵となる役割を果たすマスト細胞は、未熟な前駆細胞として骨髄から血中へ放出され、定着した末梢組織で成熟する。我々はこれまでに、腸内細菌がマスト細胞の成熟過程に作用し、転写因子 C/EBPαの発現を増大させることにより顆粒形成を抑制することを報告している。本研究では、マスト細胞の成熟過程における C/EBPαの発現制御機構を明らかにすることを目的とする。
【方法】マウス骨髄由来培養マスト細胞(BMMC)の *in vitro* 分化系を用いて解析を行った。6 週令の雌性 C57BL/6 マウスより採取した骨髄細胞を IL-3 存在下で培養し、3 週間後から 1 週間ごと経時的に以下の測定を行った。FcεRIαと c-kit の細胞表面上の発現をフローサートメトリーにより解析し、C/EBPα の mRNA 発現を定量 RT-PCR により解析した。また、C/EBPα遺伝子の 5′領域 nt -1345/-5（塩基番号は翻訳開始点を+1 とする）をクローニングし、ルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入したレポータープラスミドを構築した。このレポータープラスミドを BMMC に導入して一過性の発現試験を行い、転写プロモーター活性を測定した。さらに、バイサルファイト反応により、C/EBPα遺伝子 5’領域 nt -455/-76、nt -760/-430、nt -1170/-737、nt -1555/-1147 の DNA メチル化の解析を行った。
【結果及び考察】
培養 3 週間後から 5 週間後にかけて $FcεRI^{+}c\text{-}kit^{+}$細胞における FcεRI の増大が認められ、マスト細胞の成熟が確認された。この期間において C/EBPαの発現は、経時的に減少した。しかし、ルシフェラーゼアッセイにおいて転写プロモーター活性の低下は観察されなかった。また、nt -455/-76、nt -760/-430 領域の CpG モチーフにはほとんどメチル化は検出されなかった。一方、nt -1170/-737 領域の CpG モチーフには 4 週間後以降にわずかにメチル化が観察され、nt -1147/-1555 領域にはそれよりも高頻度でメチル化が検出された。以上の結果から、マスト細胞の成熟過程における C/EBPαの発現制御は、5′領域に結合する転写因子の発現の変化によるものではなく、プロモーター領域から 1kb 程度離れた上流領域の DNA メチル化を介したクロマチン構造の変換によることが示唆された。

mast cell, C/EBPα, DNA methylation

発表責任者：高橋恭子（ktaka@brs.nihon-u.ac.jp）

講演番号：3B10a09
講演日時：3 月 19 日 11:30～ B 校舎 10 会場

# カルノシンの腸管バリア増強効果

# Carnosine-induced augmentation of intestinal barrier

○大津 出[1]、藤井 薫[1]、佐藤 三佳子[2]、片倉 喜範[3] ([1]九大院シス生、[2]日本ハム中央研究所、[3]九大院 農院)
○Izuru OHTSU[1], Kaoru FUJII[1], Mikako SATO[2], Yoshinori KATAKURA[3] ([1]Grad. Sch. Sys. Life Sci., Kyushu Univ., [2]Research and Development Center, Nippon Meat Packers Inc., [3]Fac. Agr., Kyushu Univ.)

目的

イミダゾールジペプチドの 1 種カルノシンは β-アラニンとヒスチジンからなるジペプチドであり、鶏ムネ肉に多く含まれるとともに、ヒトの筋肉や神経組織にも多く存在している。生体内においては、緩衝作用、抗糖化作用、抗酸化作用を有することが知られており、最近ではヒト介入試験の結果から抗疲労効果や記憶機能改善効果についても報告されている。そこで本研究では、カルノシンによる腸管機能活性化に焦点を当て、カルノシンが腸管バリア機能に及ぼす影響を解析することを目的とし研究を行った。

方法

ヒト結腸ガン由来 Caco-2 細胞を腸管バリア解析のためのモデル細胞として用いた。腸管バリア機能は、経上皮電気抵抗（Transepithelial Electrical Resistance: TER）試験及びタイトジャンクション構成タンパク質の発現解析により検証した。Caco-2 細胞の分化誘導とともにカルノシンを添加し、24 時間間隔で TER 値を 15 日間測定した。また分化誘導後の Caco-2 細胞にカルノシンを添加し、TER 値の変化を追跡した。タイトジャンクション構成タンパク質の発現は、定量 RT-PCR 法あるいはウェスタンブロッティング法により検証した。

結果

カルノシンを添加しつつ分化誘導した Caco-2 細胞の TER 値は、添加していないものと比べて有為に増大していた。特に、10 mM カルノシンを添加した Caco-2 細胞の TER 値は大きく増大していた。さらに、定量 RT-PCR の結果、タイトジャンクション構成タンパク質の発現が増大していること、特に ZO-1 の発現が有為に増大していることが明らかとなった。しかしながら、10 mM カルノシンでは、タイトジャンクション構成タンパク質の発現の増大は観察されなかった。以上の結果から、カルノシンが腸管上皮細胞におけるタイトジャンクション構成タンパク質の発現増強を通じて、バリア機能を増強していることが明らかとなった。

Carnosine, TER, tight junction

講演番号：3B10a10
講演日時：3 月 19 日 11:45～ B 校舎 10 会場

抗酸化剤によるタンパク質の自然抗体エピトープへの変換
Conversion of proteins into innate epitopes by antioxidants
古橋 麻衣[1]、○河村 沙絵[1]、畑佐 行紀[1]、柴田 貴広[1]、内田 浩二[1,2] ([1]名大院・生命農、[2]東大院・農学生命)
Mai FURUHASHI[1], ○Sae KAWAMURA[1], Yukinori HATASA[1], Takahiro SHIBATA[1], Koji UCHIDA[1,2] ([1]Grad. Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ., [2]Grad. Sch. of Agri. and Life Sci., Univ. of Tokyo)

【背景】
抗酸化剤は酸素に鋭敏であるため、不安定な中間体を経て、様々な酸化物へと変換される。しかしこれまでに、こうした不安定な中間体に焦点を当てた研究はほとんど行われていない。これまでに当研究室では血中の主要タンパク質である血清アルブミンが、代表的な緑茶カテキンであるエピガロカテキンガレート（EGCG)と反応することで自然抗体に認識されることを明らかにした。また、その詳細な分子機構解析により、EGCG が自動酸化された後にタンパク質リジン残基と結合してシッフ塩基を形成し、タンパク質が脱アミノ化を受けることによりタンパク質カルボニルを生成することが示された（Hatasa et.al., PLoS ONE, 2016)。一方、この反応において、タンパク質から EGCG へのアミノ基の転移により、不安定な中間体であるアミノ化 EGCG（NH2-EGCG）が生成される。本研究では、この NH2-EGCG が EGCG の食品成分としての生体内での機能発現において重要であるものと考え、LC-MS/MS を用いた高感度検出を試みた。
【方法・結果】
EGCG と HSA を 37 OC、3 時間反応させ、反応液からタンパク質を除いたものをサンプルとして、LC-MS/MS を用いて分析を行ったところ、HSA との反応において NH2-EGCG に相当する質量電荷比のピークが確認された。しかし NH2-EGCG は不安定であるため、正確な検出定量が困難であるものと考えられたことから、アミノ基誘導体化試薬である 2,4-dinitrofluorobenzene（DNFB）を用いた NH2-EGCG の安定的検出法の確立を試みた。EGCG と HSA の反応物に DNFB を加えて 60 OC で 1 時間反応させた後、LC-MS/MS を用いて分析を行ったところ、ジニトロフェニル（DNP）化誘導体（DNP-NH2-EGCG）に相当する質量電荷比のピークが検出された。また、EGCG とヒト血清との反応においても、この DNP-NH2-EGCG に由来するものと思われるピークが明瞭に検出された。それとともに、EGCG とのインキュベーションによりカルボニル化される特異的なタンパク質が検出されたことから、EGCG に対する高感受性タンパク質がヒト血清中に存在するものと考えられた。現在、このタンパク質の同定とともに、動物実験などにおける NH2-EGCG の検出を進めている。

natural antibody, EGCG, serum albumin

講演番号：3B10p01
講演日時：3 月 19 日 14:00～ B 校舎 10 会場

# フラボノイドによるビフィズス菌の抗炎症活性増強メカニズムおよび活性成分に関する解析

# Analysis of anti-inflammatory activity of bifidobacteria and its enhancement by flavonoids

○川畑 球一[1]、萩原 光太[2]、馬場 信行[2]、石井 剛志[1]、大東 肇[2]、村上 茂[2]（[1]神戸学院大栄養、[2]福井県大・生物資源）
○ Kyuichi KAWABATA[1], Kota HAGIWARA[2], Nobuyuki BABA[2], Takeshi ISHII[1], Hajime OHIGASHI[2], Shigeru MURAKAMI[2] ([1]Kobe Gakuin Univ., [2]Fukui Prefec. Univ.)

【目的】 ビフィズス菌は腸内フローラにおける主な構成菌種であり、食物繊維を代謝して酢酸や乳酸を生成して腸内環境を整えるといった有用な働きを持つ。我々はプロバイオティクスとポリフェノールの機能的な相互関係について研究を進めており、ケルセチンやEGCgなど数種のフラボノイドがビフィズス菌（*Bifidobacterium adolescentis*）の一酸化窒素（NO）産生抑制活性を顕著に増強することをこれまでに報告している[1,2]。さらにそれらは、*B. adolescentis*の酢酸と乳酸の産生能にも影響を与えることを確認している。これらの知見はフラボノイドが腸内においてビフィズス菌の機能性を向上させる可能性を強く示唆している。本研究では、フラボノイドが*B. adolescentis*の抗炎症活性を増強する作用機序および活性成分に関する解析を行った。
【方法】 *B. adolescentis* JCM1275$^{T}$株は理研BRCより購入し、GAM培地にて嫌気条件下で培養した。*B. adolescentis*（$10^{8}$ cfu/mL）は、各種フラボノイド（終濃度20-40 μM）もしくは溶媒（DMSO）を添加したDMEMにて嫌気条件下で3時間培養し、2回の遠心により菌体を除去して培養上清を得た。これをマウスマクロファージRAW264細胞に添加してLPS刺激し、NOや炎症性メディエーターの産生に対する抑制作用を評価した。また、活性成分の性状に関する知見を得るため、細胞に添加する直前に培養上清を熱処理（100℃、30分）や限外ろ過、液液分配に供した。酢酸および乳酸のNO産生抑制活性を検討するため、酢酸ナトリウムおよび乳酸ナトリウムの水溶液を調製し、濾過滅菌後に細胞へと添加した（終濃度1.3-20 mM）。
【結果】 ケルセチンは培地中で速やかに自然分解する。そこでまず、ケルセチンが *B. adolescentis* にどのように作用しているのか検討するため、ケルセチンのみを添加して 2 時間静置した培地を用いて *B. adolescentis* を培養した結果、その培養上清に抗炎症活性はほとんど認められなかったことから、増強効果を発揮する上でケルセチンの構造が重要であることが明らかとなった。さらに、メチル化 EGCg を用いた実験からもフラボノイド骨格の重要性が示唆された。熱処理もしくは限外ろ過を施した培養上清の抗炎症活性を評価した結果、活性成分は耐熱性を有する分子量 3 kDa 以下の物質であることが明らかとなった。次に、酢酸エチルおよびn-ブタノールにより培養上清を順次分配し、得られた有機層と水層の活性を評価したところ、水層に強い活性が認められた。そこで、培養上清の pH を変えて酢酸エチル分配および活性評価を行った結果、酸性条件での分配により有機層に活性が認められたことから、活性成分は酸性物質である可能性が強く示唆された。一方、酢酸と乳酸の NO 産生抑制活性は非常に弱く、*B. adolescentis* 由来の抗炎症活性成分である可能性は低いと考えられた。現在、活性成分の精製と同定を目指して、さらに詳細な解析を進めている。
[1]Kawabata K. et al., *BioFactors*, 2013; [2] Kawabata K., et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2015

Bifidobacteria, Flavonoid, Anti-inflammatory activity

発表責任者：川畑球一（kyuichi@nutr.kobegakuin.ac.jp）

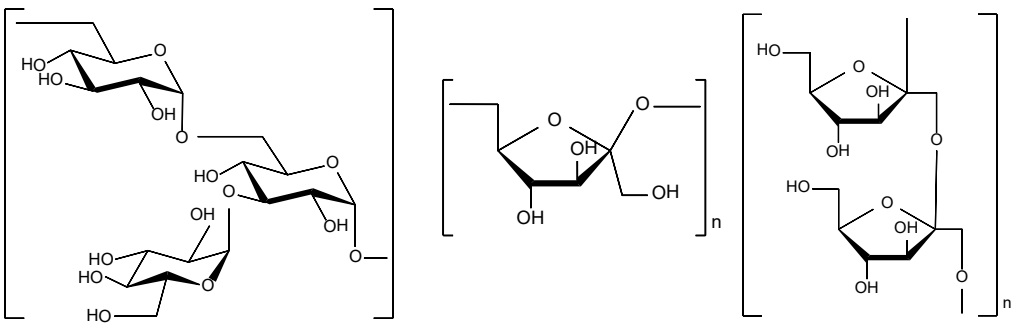
講演番号：3B10p02
講演日時：3 月 19 日 14:15～ B 校舎 10 会場

# 免疫賦活効果を有する *Leuconostoc mesenteroides* NTM048 株由来菌体外多糖の構造解析

# Structural characterization of the immunostimulating exopolysaccharide produced by *Leuconostoc mesenteroides* strain NTM048

○松崎 千秋[1]、杉原 美乃里[1]、桑原 美沙[1]、苫米地 祐輔[1]、Lennart Forsberg[2]、Parastoo Azadi[2]、松本 健司[1]、加藤 紀彦[3]、糸乗 前[4]、山本 憲二[1]、久 景子[1,5]（[1]石川県大、[2]ジョージア大、[3]京大院・生命、[4]滋賀大・教育、[5]日東薬品工業（株））
○ Chiaki Matsuzaki[1], Minori Sugihara[1], Misa Kuwabara[1], Yusuke Tomabechi[1], Forsberg Lennart[2], Azadi Parastoo[2], Kenji Matsumoto[1], Toshihiko Katoh[3], Saki Itonori[4], Kenji Yamamoto[1], Keiko Hisa[1,5] ([1]Ishikawa Prefectural Univ., [2]Georgia Univ., [3]Kyoto Univ., [4]Shiga Univ., [5]Nitto Pharm. Ind., LTD.)

【目的】近年、乳酸菌が菌体外に産生する多糖（EPS）が示す、免疫調節効果、コレステロール値抑制効果、抗腫瘍活性などの、さまざまな生理活性効果に注目が集まっている。我々は野菜由来の乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* NTM048 株の産生する EPS が、粘膜免疫を増強する IgA 産生誘導効果、全身免疫を誘導する脾臓免疫細胞の賦活効果を示すことを、マウスを用いた *in vitro* および *in vivo* 試験において明らかにしている（Matsuzaki et al. *J. Appl. Microbiol.* 2014, *J. Agric. Food Chem.* 2015）。本研究では、この EPS を機能性食品素材として利用するために、化学構造を明らかにするとともに、得られた化学構造をもとに、機能性の向上を試みた。
【方法】NTM048 株産生の EPS をゲル濾過クロマトグラフィーにて精製して構造解析を行った。EPS の構成糖は、過塩素酸にて加水分解した試料を HPAEC-PAD によって分析した。グルコース含量は TMS 化した試料を GC-MS によって解析し、糖の結合様式は、PMAA 法によって誘導体化した試料を GC-MS にて分析した。さらに $^{1}H$-$^{13}C$ HSQC、$^{1}H$-$^{13}C$ HMBC、$^{1}H$-$^{13}C$ H2BC、$^{1}H$-$^{1}H$ NOESY による 2 次元 NMR によって詳細な構造を決定した。
【結果】HPAEC-PAD による EPS の構成糖の分析により、グルコースとフルクトースに相当するピークが検出され、TMS 化試料および PMAA 誘導体化試料の GC-MS 解析によりグルコース残基は 96%、フルクトース残基は 4%含まれることを明らかにした。また糖の結合様式の解析では、1,6 結合および 1,3 結合由来のグルコース、2,1 結合および 2,6 結合由来のフルクトースのピークが検出され、さらに 2 次元 NMR によって解析したところ、α-1,6 グルコースの主鎖にα-1,3 グルコースの分岐を 4%有するデキストラン、β-2,1 フルクタン、およびβ-2,6 フルクタンの 3 種類の糖鎖によって構成されていることが明らかとなった（下図）。本研究により本菌由来の EPS にβ-2,1 結合のフルクタンが存在することを初めて明らかにした。これらの化学構造の情報をもとに、グルコースのα-1,6 結合に作用するデキストラナーゼなどを用いて加水分解を行い、物性や機能の変化について検討している。



*Leuconostoc mesenteroides*, exopolysaccharide, lactic acid bacteria

発表責任者：松崎千秋（chiaki@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：3B10p03
講演日時：3 月 19 日 14:30～ B 校舎 10 会場

Feeding exopolysaccharides from Leuconostoc mesenteroides NTM048 reduces chronic kidney diseases through protection of intestinal tight junction barrier in mice.

○ Hung Tran Van[1], Hisa Keiko[2], Yonejima Yasunori[2], Suzuki Takuya[1] ([1]Department of Biofunctional Science and Technology, Hiroshima Univ., [2]Research and Development Department, Nitto Pharmaceutical Industries, Ltd.)

[Background and aim] Chronic kidney disease (CKD) is a worldwide health problem and can lead to cardiovascular disease and end-stage kidney disease. Although the pathogenesis of CKD is still unclear, recent studies suggest that the uremic toxins-induced disturbance of intestinal microflora and barrier is involved in the development of kidney inflammation. We previously found that exopolysaccharides produced from Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides strain NTM048 (NTM048 EPS) isolated from green peas increased short chain fatty acids (SCFAs) in large intestines and ameliorated psoriasis in mice(2016 Annual Meeting of JSBBA). This study investigated the effect of NTM048 EPS on the CKD development with focusing on intestinal tight junction (TJ) barrier in mice. [Methods] ICR mice (male, 7 weeks old) fed AIN-93G based diets without or with 0.25% adenine for 2 weeks to induce CKD. The adenine-fed mice were then divided into 2 groups and fed diets without or with 10% NTM048 EPS for 3 weeks, respectively. Mice without the adenine diet were given the control diet for 3 weeks. Plasma urea and lipopolysaccharide binding protein (LBP, an indicator of intestinal barrier) were measured. Expression of TJ (ZO-1, ZO-2, occludin, JAM-A, claudin-3, claudin-4 and claudin-7) in mouse colons were analyzed by immunoblot analysis. Expression of inflammatory cytokines in kidneys and colons were analyzed by RT-qPCR. [Results] Feeding adenine increased the plasma urea and inflammatory cytokine expression in kidneys (TNF-α, IL-6 and MCP-1), indicating CKD development. In these CKD mice, the increased plasma LBP level and impaired TJ protein expression and increased inflammatory cytokines (TNF-α, IL-6, IL-17a and IFN-γ) of colons were also observed, indicating TJ barrier disruption and inflammation in colons. Supplemental NTM048 EPS partially or totally restored these abnormalities. [Discussion and conclusion] Our results suggest that restoration of the colon TJ barrier is a likely mechanism for the NTM048 EPS-mediated prevention of CKD development. Modification of intestinal microflora or SCFA production by feeding NTM048 EPS may have a role for the protection of TJ barrier. Analysis of fecal SCFAs and IgA levels will be also presented on the meeting.

Chronic kidney disease, Leuconostoc mesenteroides, Tight junction

講演番号：3B10p04
講演日時：3 月 19 日 14:45～ B 校舎 10 会場

# *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2038 株及び *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* 1131 株による腸管における抗菌ペプチドの発現誘導メカニズム

# The mechanism for inducing production of antimicrobial peptides in the intestine by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2038 strain and *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* 1131 strain

○小林 杏輔、狩野 宏、浅見 幸夫（（株）明治）
○Kyosuke KOBAYASHI, Hiroshi KANO, Yukio ASAMI (Meiji Co., Ltd.)

【背景・目的】

当社の研究により、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2038 株（*L. bulgaricus* 2038 株）と *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* 1131 株（*S. thermophilus* 1131 株）で発酵したヨーグルトをマウスに投与することにより腸管における抗菌ペプチド Reg3b 及び Reg3g の遺伝子発現が誘導されることが明らかになっている。Reg3b 及び Reg3g はそれぞれグラム陽性菌とグラム陰性菌に対して抗菌作用を示すことが報告されており、外来の微生物から腸管を保護することで恒常性の維持に貢献している。また、先行研究から、抗原提示細胞が IL-23 を産生し、他のサイトカインや細胞を介して Reg3b 及び Reg3g を産生することが推定されている。本研究では本仮説を検証するため、一連の細胞応答の第一段階である IL-23 の産生応答に関し、*L. bulgaricus* 2038 株及び *S. thermophilus* 1131 株による樹状細胞からの IL-23 産生誘導の確認、さらにはこれら菌株による樹状細胞からの IL-23 産生誘導における TLR の関与を検証した。

【方法】

マウス骨髄由来樹状細胞株 tsDC の *Myd88* を RNAi によってノックダウンし、*L. bulgaricus* 2038 株及び *S. thermophilus* 1131 株加熱死菌体の存在下で培養したときの培養上清中に産生された IL-23 の濃度を ELISA 法により測定した。次に TLR2、TLR7、TLR9 をそれぞれノックアウト（KO）したマウス由来の BMDC を *L. bulgaricus* 2038 株及び *S. thermophilus* 1131 株加熱死菌体の存在下で培養したときの IL-23 の産生量を同様に測定した。

【結果・考察】

tsDC を *L. bulgaricus* 2038 株あるいは *S. thermophilus* 1131 株加熱死菌体の存在下で培養することで IL-23 が産生された。*Myd88* をノックダウンすることで IL-23 の産生が顕著に抑制されたことから、IL-23 の産生には主に TLR を介したシグナル伝達が関与していると考えられた。TLR2 KO マウス由来の BMDC では IL-23 の産生が一部低下した。一方、TLR7、TLR9 KO マウス由来の BMDC では IL-23 の産生が低下しなかった。これらの結果から、*L. bulgaricus* 2038 株及び *S. thermophilus* 1131 株が樹状細胞における IL-23 の産生を誘導することで Reg3b 及び Reg3g の発現誘導に寄与していることが考えられ、TLR2、TLR7、TLR9 はこれら菌株の刺激による IL-23 の産生に必ずしも重要ではなく、他の TLR ファミリーが関与していることが考えられた。

antimicrobial peptide, Toll-like receptor, Interleukin-23

発表責任者：小林杏輔（kyousuke.kobayashi@meiji.com）

講演番号：3B10p05
講演日時：3 月 19 日 15:00～ B 校舎 10 会場

乳酸菌 *Lactobacillus gasseri* SBT2055 の RS ウイルス増殖抑制効果
*Lactobacillus gasseri* SBT2055 is effective to inhibit the replication of RS virus

○江口 慧[1]、浮辺 健[1]、河野 通生[1]、關 敬弘[1]、馬場 一信[2]、猪村 帝[2]、田中 くみ子[2]、松原 由美[2]、中川 久子[2]、宮崎 忠昭[2] ([1]雪印メグミルク株式会社・ミルクサイエンス研究所、[2]北海道大学・遺伝子病制御研究所)
○Kei EGUCHI[1], Ken UKIBE[1], Michio KAWANO[1], Takahiro SEKI[1], Kazunobu BABA[2], Mikado IMURA[2], Kumiko TANAKA[2], Yumi MATSUBARA[2], Hisako NAKAGAWA[2], Tadaaki MIYAZAKI[2] ([1]Milk Science Research Institute, Megmilk Snow Brand Co., Ltd., [2]Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University)

【背景、目的】

これまでに、*Lactobacillus gasseri* SBT2055（LG2055）をマウスに経口投与することにより、インフルエンザ A ウイルス（IFV）感染後の生存率が上昇し、肺においてウイルスの増殖が抑制されることを報告した。LG2055 は宿主細胞の抗ウイルス遺伝子の発現誘導を介して IFV の増殖を抑制すると考えられ、同様の増殖機構を有する他のウイルスに対しても増殖抑制効果を示す可能性がある。

Respiratory syncytial virus（RS ウイルス、RSV）はヒトの呼吸器に感染して風邪様症状を引き起こすウイルスであり、IFV と同じくエンベロープ保有の 1 本鎖 RNA ウイルスである。ウイルス感染後、乳幼児、高齢者および免疫不全者において症状が重篤化することがあり、発展途上国においては、RSV 感染は乳幼児が死亡する主要な原因の 1 つとなっている。本邦においても年間 2 万人から 3 万人が RSV 感染により入院していると推測されており、RSV は公衆衛生上大きな問題にされているウイルスである。

以上の背景から、本研究では LG2055 の RSV に対する増殖抑制効果を調べることを目的とした。

【方法、結果】

多くの実験で RSV 感染に使用されるヒト喉頭がん由来細胞 HEp-2 細胞に LG2055 を添加して 24 時間培養し、その後 RSV に感染させ、感染後も LG2055 を添加し培養した。RSV 感染 48 時間後の細胞内遺伝子発現量を real-time PCR で評価したところ、LG2055 添加により RSV 特異的遺伝子量が減少していた。また、RSV 感染により炎症性サイトカイン IL-6 の遺伝子発現が亢進したが、LG2055 はこの発現亢進を抑制した。マウス肺由来細胞である MLE12 細胞を用いて LG2055 の RSV 増殖抑制効果を検討した結果、MLE12 細胞においても LG2055 添加により RSV 特異的遺伝子量が減少していた。そこで、5 週齢の雌性 BALB/c マウスに LG2055 を 3 週間経口投与し、その後 RSV を感染させた。感染 4 時間後に再度 LG2055 を経口投与し、その 20 時間後の肺でのウイルス力価を評価した結果、LG2055 投与群においてウイルス力価が低減していた。

【結論】

LG2055 はヒト由来喉頭細胞において RSV 増殖抑制効果を示し、RSV 感染により惹起される炎症を抑制する可能性が示された。また、マウス由来細胞においても LG2055 は RSV 増殖抑制効果を示し、マウス感染実験においても、LG2055 は RSV 感染防御効果を有する可能性が示された。

Lactobacillus, RS virus, Lung

講演番号：3B10p06
講演日時：3 月 19 日 15:25～ B 校舎 10 会場

# 腸内細菌叢による GABA 産生の解析

# Analysis of GABA production by gut microbiota

○楢林 ひかり、高橋 恭子、坪井 瑞季、杉 由高、中田 一彰、倉岡 克弥、藤 佑志郎、松藤 寛、花澤 重正（日大生物資源科学部）
○Hikari Narabayashi, Kyoko Takahashi, Mizuki Tsuboi, Yutaka Sugi, Kazuaki Nakata, Katsuya Kuraoka, Yushiro Fuji, Hiroshi Matsufuji, Shigemasa Hanazawa (Nihon Univ.)

[目的]

生体に存在するアミノ酸の一つで抑制性の神経伝達物質として知られるγ-アミノ酪酸(GABA)は、精神安定作用や血圧上昇抑制作用、免疫増強作用など多様な生理作用を示す。これまでに特定の乳酸菌が培養上清中に GABA を産生することが報告されている。一方、腸内細菌叢と様々な疾患との関わりが近年明らかになってきており、免疫疾患や生活習慣病等に加えてうつや自閉症などの精神疾患にも関与することが示されている。本研究では、腸内細菌が in vivo の腸管において GABA を産生するのか、腸内細菌叢の構成と GABA 濃度に相関があるのかどうかを明らかにすることを目的とした。

[方法]

6 週令の雌性 BALB/c マウスを 4 群(n=3)に分け、1 週間の馴化飼育後、それぞれの群に抗生物質アンピシリン、メトロニダゾール、バンコマイシン、ネオマイシンを飲水に添加して 4 週間自由摂取させた。対照群として滅菌水を 4 週間与えたマウス 1 群(n=3)を用意した。各個体別に一週間ごとに糞便を採取した。採取した糞便について熱水/超音波処理を行い、抽出液を得た。その後 AccQ-Tag Ulrta システム(Waters 社)を用いた誘導体化反応を行い、UPLC-MS/MS により分析した。GABA 標準品の希釈系列を同様に分析して検量線を作成し、糞便 1mg あたりの GABA 濃度を算出した。

[結果]

メトロニダゾール投与群では投与前から投与 4 週間後にかけて糞便中の GABA 濃度が減少する傾向がみられ（平均 12.1μmol/mg 減少）、ネオマイシン投与群では逆に経時的に上昇する傾向が認められた（平均 33.6μmol/mg 増加）。一方、アンピシリン投与群、バンコマイシン投与群では、それぞれ投与前後で GABA 濃度のわずかな減少、増加が観察されたが顕著な差は見られなかった。

[考察]

異なる種類の抗生物質の投与により糞便中の GABA 濃度に変化が認められたことから、腸内細菌叢の変化によって、腸管内の GABA 濃度が変動すると考えられた。すなわち、腸管の GABA 濃度は腸内細菌叢の構成に依存することが示唆された。メトロニダゾール 投与群で GABA 濃度が減少、ネオマイシン投与群で上昇したことから、メトロニダゾール感受性でネオマイシン耐性の菌が GABA を腸管内で豊富に産生する可能性がある。現在、各群の抗生物質投与前後の腸内細菌叢の構成について 16sRNA 遺伝子の配列解析を行っている。

GABA, intestine, commensal bacteria

発表責任者：高橋 恭子（ktaka@brs.nihon-u.ac.jp）

講演番号：3B10p07
講演日時：3 月 19 日 15:40～ B 校舎 10 会場

# 大豆サポニンの接触過敏症抑制効果における腸内細菌叢の作用

# Impact of gut microbiota on the inhibitory effct of contact hypersensitivity by soyasaponin

○長野 隆男[1]、亀崎 彩紗[1]、三宅 沙知[1]、片瀬 満[2]、津村 和伸[2]、後川 潤[3]、齊藤 峰輝[3]、矢野 博己[4]、松田 幹[5]([1]川崎医福大臨床栄養、[2]不二製油、[3]川崎医大微生物、[4]川崎医福大健康体育、[5]名大生命農)

○ Takao NAGANO[1], Ayasa KAMEZAKI[1], Sachi MIYAKE[1], Mitsuru KATASE[2], Kazunobu TSUMURA[2], Hiroshi USHIROKAWA[3], Mineki SAITO[3], Hiromi YANO[4], Tsukasa MATSUDA[5] ([1]CN, Kawasaki Univ. Med. Wel., [2]Fuji Oil, [3]Kawasaki Med. Univ., [4]HS, Kawasaki Univ. Med. Wel., [5]Nagoya Univ.)

【目的】マウスを用いた接触過敏症（CHS）動物実験系は，アレルギー性接触皮膚炎のよいモデル動物実験系と考えられている。前回，我々は CHS 動物実験系を用いて大豆サポニン（SS）の CHS 抑制効果を検討した。その結果，１）SS は CHS 抑制効果を示すこと，２）SS の CHS 抑制効果に腸内細菌叢が関与している可能性が示された。本研究では，抗生剤を用いて SS の CHS 抑制効果に及ぼす腸内細菌叢の作用について明らかにすることを目的とした。

【方法】SS としてソイヘルス SA（SA，不二製油），抗生剤としてバンコマイシン（V）を使用し，マウスには飲料水として実験開始 3 週間前から自由摂取させた。実験は，CHS マウス/水摂取（対照群，n = 6），CHS マウス/V 溶液摂取（抗生剤摂取群，n = 6），CHS マウス/SA 溶液摂取（SS 摂取群，n = 6），CHS マウス/SA と V 溶液摂取（SS と抗生剤摂取群，n = 6）の 4 群で行った。マウスは，実験 0 日目と 1 日目に 0.5% ジニトロフルオロベンゼン（DNFB）を腹部に感作した後，実験 5 日目と 12 日目に 0.2% DNFB を耳介部にチャレンジした。以下の評価は，2 回目の DNFB チャレンジをした 24 時間後に行った。耳介の腫れはマイクロメータで測定し，耳介組織への炎症細胞の浸潤は抗 Gr-1 抗体を用いた免疫組織化学染色により行った。制御性 T 細胞（$T_{reg}$）は耳介リンパ節と脾臓を試料として FACS を用い，腸内細菌叢は糞を試料として次世代シーケンサー（NGS）を使用して解析した。

【結果】耳介の腫れを測定したところ，対照群と比較して SS 摂取群で有意な腫れの抑制が見られたが，SS と抗生剤摂取群では SS の抑制効果は低下し，有意差は観察されなくなった。耳介組織への炎症細胞の浸潤を調べたところ，対照群と比較して SS 摂取群で有意な炎症細胞の浸潤抑制が見られたが，SS と抗生剤摂取群では SS の抑制効果は低下し，有意差は認められなくなった。脾臓と耳介リンパ節における $T_{reg}$ を調べたところ，対照群と比較して SS 摂取群で有意な増加が見られたが，SS と抗生剤摂取群では有意差は認められなかった。NGS で腸内細菌叢を調べた結果，今回実験を行った 4 群間での総リード数に有意差は認められなかった。このことから，抗生剤の摂取で腸内細菌の総数は低下しないと考えられた。主成分分析の結果から，対照群と SS 摂取群で違いは見られず，抗生剤を摂取した群と摂取していない群で違いが観察された。抗生剤を摂取していない群では様々な腸内細菌（科レベル）が検出されたが，抗生剤摂取群ではそれらの多くが消失し *Lactobacillaceae* と *Entrobacteriaceae* が増加していた。以上の結果から，SS の CHS 抑制効果は SS が腸内細菌叢に作用して $T_{reg}$ が増加することによると考えられた。

soyasaponin, contact hypersensitivity, gut microbiota

講演番号：3B10p08
講演日時：3 月 19 日 15:55～ B 校舎 10 会場

小腸パイエル板細胞による IgA 産生応答における腸内細菌及びレチノイン酸による修飾作用
IgA production by Peyer's patch cells is modified by commensal bacteria and retinoic acid
○石井 涼太[1]、石井 俊祐[1]、津田 真人[1]、高橋 恭子[2]、八村 敏志[3]、細野 朗[1]、上野川 修一[1]([1]日大生資科・食品生命、[2]日大生資科・応用生命、[3]東大院農生科・食の安全研究セ)
○ Ryota ISHII[1], Shunsuke ISHII[1], Masato TSUDA[1], Kyoko TAKAHASHI[2], Satoshi HACHIMURA[3], Akira HOSONO[1], Shuichi KAMINOGAWA[1] ([1]Dept. Food Bioscience Biotechnol., Nihon Univ., [2]Dept. Applied Life Sciences, Nihon Univ., [3]Res. Cent. Food Safety, Univ. Tokyo)

【目的】 腸管免疫系の IgA 抗体は、常時、抗原や腸内細菌等に曝されている腸粘膜組織における生体防御機構として重要な役割を担っている。これまでに無菌マウスを用いた実験より腸内細菌が存在する腸内環境において強く IgA 産生応答が誘導されることが示唆されており、また、食品成分、特にビタミン A の代謝産物であるレチノイン酸が IgA 産生応答の誘導に強く関与していることが明らかとなっている。しかしながら、腸内細菌と食品成分の複合的な免疫刺激が腸管免疫系細胞応答に与える影響については、不明な点が多い。本研究では腸管免疫系の主要な応答である IgA 産生応答に関与する細胞応答について、特に腸内細菌や食品成分によって免疫修飾される機構の解明を行うことを目的とした。
【方法】 雌性 BALB/c マウスの小腸より腸管免疫系の誘導組織であるパイエル板を採取し、細胞調製を行った。そこにマウス由来腸内細菌分離株の *Bacteroides acidifaciens* type A43（BA）、*Lactobacillus johnsonii* 129（LJ）の加熱死菌体をそれぞれ 0、10、50 μg/mL、食品成分としてレチノイン酸（RA）を 0、1、10、100 nM の濃度で刺激させ、7 日間培養を行った。そして細胞培養上清中の IgA 産生量を ELISA 法により定量し、IgA 産生応答に及ぼす菌体成分や RA の修飾作用についての検討を行った。
【結果】 小腸パイエル板細胞の IgA 産生応答に対する菌体刺激の影響は菌種により異なり、BA は LJ に比べて高い IgA 産生応答がみられ、特に BA 50 μg/mL 刺激下で最も高かった。この実験条件では RA 単独刺激によって IgA 産生応答は亢進しなかったが、BA と RA を共刺激することによって、BA 単独刺激と比較して IgA 産生量は亢進した。特に BA 50 μg/mL と RA 10 nM で共刺激すると、最も IgA 産生量が高かった。すなわち、腸管腔の小腸部位では、経口摂取した食品成分やその代謝産物が腸内に共生する腸内細菌との複合的な刺激によって腸管免疫系が修飾される可能性が考えられた。さらに、BA および RA 刺激による PP 細胞への細胞分化に及ぼす影響を検討中である。

Retinoic acid, Intestinal commensal bacteria, Intestinal Immunity

講演番号：3B10p09
講演日時：3 月 19 日 16:10～ B 校舎 10 会場

Caco-2 細胞における牛乳カゼインミセルの細胞内消化と経細胞極性輸送：LC-MS/MS による定量的解析
Intracellular digestion and polar transcytosis of bovine milk-casein micelles by Caco-2 cells: quantitative analysis using LC-MS/MS
○櫻井 那央、西尾 俊亮、秋山 友香、大島 健司、灘野 大太、松田 幹（名大院・生命農）
○Nao SAKURAI, Syunsuke NISHIO, Yuka AKIYAMA, Kenzi OSHIMA, Daita NADANO, Tsukasa MATSUDA (Nagoya Univ.)

【背景と目的】食物アレルギーでは、未分解のタンパク質や抗原性を有したペプチドが腸管から吸収され、アレルギー症状を引き起こす。乳の主要タンパク質であるカゼイン（CN）は消化性に優れるが、牛乳アレルギーにおける主要アレルゲンでもある。これまでに、牛乳 CN が、多孔性膜上で培養した腸上皮様細胞株（Caco-2）により頂端側から取り込まれ、CN 構成成分の一部が基底側に放出されることを定性的に明らかにした（2016 年度札幌大会）。本研究では、CN ミセルとして細胞内に取り込まれた後、経細胞輸送により基底側に放出されるミセル構成成分 CN およびその細胞内消化断片について質量分析法により同定および定量的に解析することを目的とした。
【方法】Caco-2 細胞を膜面積 0.3 $cm^2$ の多孔性膜上で培養した *in vitro* 腸上皮様モデルを用い、牛乳 CN（1 mg/ml）を頂端側培地に添加して培養した後、基底側の培養液を回収した。さらに、CN を含まない新鮮培地に交換し再び培養した後、基底側の培養液を回収した。培地に含まれるタンパク質とペプチドを限外濾過膜（MWCO:10 kDa）により分画し、10 kDa 以上の画分をトリプシン消化した後、LC-MS/MS (nano-LC/cHiPLC-QTRAP5500）により同定および定量した。馴化培地に添加した CN を標準 CN として同様に分析し、Protein Pilot によりペプチドを同定した後、Skyline を用いて MRM メソッドを構築した。このウシ CN-MRM メソッドを用いて回収した培地中の CN を分析し、MultiQuant ソフトウェアを用いて４種のミセル構成成分 CN（αs1-CN, αs2-CN, β-CN, κ-CN）を定量した。
【結果】標準 CN の LC-MS/MS 分析により、４種の成分 CN のそれぞれに２−３種のトリプシンペプチドが同定された。これらを標準にして基底側培地中の CN を定量分析した結果、同一 CN 成分由来の複数のトリプシンペプチドの検出量（培地中の総量）は大きく異なっており、細胞内限定分解により生成した CN 断片が基底側に放出されたものと推定された。各成分 CN 断片の中で最高値を示したトリプシンペプチドは、αs1-CN（His23-Arg37）：180 fmol, αs2-CN（Asn130-Arg140）：570 fmol, β-CN（Tyr129-Arg137）：19 fmol, κ-CN: 検出限界以下、であった。４種の成分 CN 間のおよそのモル比は、αs1-CN : αs2-CN : β-CN : κ-CN＝10 : 28 : 1 : 0 で、ミセル中の組成モル比（αs1-CN : αs2-CN : β-CN : κ-CN＝4 : 1 : 3 : 1）とは大きく異なっていた。αs2-CN 断片が細胞内消化されにくく基底側に優勢に放出されることが示唆された。２回目に回収した培地中の CN は 1/10 以下に減少していた。

Intestinal epithelial cells, Food allergy, Casein micelle

講演番号：3B10p10
講演日時：3 月 19 日 16:25～ B 校舎 10 会場

# 食物繊維ペクチンによるパイエル板ミエロイド細胞の活性化制御機構の解析

# Dietary pectin regulates activation of myeloid cells in Peyer's patch

○石其 慧太[1]、北口 公司[1,2]、矢部 富雄[1,2] ([1]岐阜大院・連農・生資科、[2]岐阜大・応生科・応用生命)
○KEITA ISHISONO[1], KOHJI KITAGUCHI[1,2], TOMIO YABE[1,2] ([1]Unit. Grad. Sch. of Agri. Sci, Gifu Univ., [2]Fac. of Appl. Biol. Sci., Gifu Univ.)

【目的】

これまでに我々は，敗血症モデルマウスを用いた実験により，水溶性食物繊維であるペクチンの摂取が LPS により誘導される体温低下と血中 Interleukin (IL)-6 上昇を緩和することを報告してきた。その際に，パイエル板における炎症性サイトカイン遺伝子発現量が低下していたことから，ペクチンの摂取は，パイエル板細胞の活性化を制御していることが予想された。本研究では，ペクチンがパイエル板細胞の活性化を制御する作用機序を明らかにすることを目的とした。

【方法】

ペクチン摂取がパイエル板細胞の IL-6 産生に与える影響を解析するために, *ex vivo* の実験を行った。8-10 週齢の雄性 C57BL/6 マウスに，シトラス由来ペクチン水溶液(10 mg/mL)を 10 日間自由摂水させた。対照群には脱イオン水を与えた。マウスからパイエル板を採取し，パイエル板細胞懸濁液を調製した。この細胞懸濁液をカルチャープレートに播種し，LPS もしくは LPS/Interferon (IFN)-γ で刺激することで IL-6 の産生を誘導した。培地中の IL-6 濃度は ELISA により測定した。さらに，パイエル板細胞から，$CD11c^+$細胞もしくは $B220^+$細胞を磁気分離法によりソーティングし，同様に IL-6 産生能を評価した。また直接的なペクチンの影響を解析するために, マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞への添加実験を行った。細胞にシトラスペクチンを添加して培養した後に, Toll-like receptor (TLR) リガンド刺激で誘導される炎症性サイトカイン発現量を qPCR 法と ELISA により測定した。

【結果】

パイエル板細胞の IL-6 産生量はペクチン摂取により 30%程度に低下していた。さらに，パイエル板に多数存在する $B220^+$細胞ではペクチン摂取による IL-6 産生量の低下は観察されなかったが, $B220^-$細胞ならびに $CD11c^+$細胞では有意な IL-6 産生量の低下が確認された。細胞添加実験においては，ペクチンの添加より LPS，Pam3CSK4，Poly(I:C)および CpG により誘導される IL-6 産生量が低下していた。一方でペクチン添加による TLR4 および CD14 の発現量に有意な変化は観察されなかった。

以上の結果より，シトラスペクチンの摂取はパイエル板ミエロイド系細胞における TLR シグナルを制御し，炎症病態を緩和する可能性が示唆された。

Peyer's patch, dietary fiber, inflammation

発表責任者：北口公司（kkohji@gifu-u.ac.jp）

講演番号：3B10p11
講演日時：3 月 19 日 16:50～ B 校舎 10 会場

# 大腸リンパ節特徴的に存在する自然リンパ球の解析

# The characteristics of innate lymphoid cells from gut-associated lymphoid tissue in the large intestine

○畑井 俊哉[1]、上滝 隆太郎[2]、津田 真人[1]、高橋 恭子[1]、細野 朗[1]、八村 敏志[2]([1]日大　生資科、[2]東大院　農生科　食の安全研セ)
○ Syunya HATAI[1], Ryutaro KOUTAKI[2], Masato TSUDA[1], Kyoko TAKAHASHI[1], Akira HOSONO[1], Satoshi HACHIMURA[2] ([1]Nihon Univ, [2]Tokyo Univ)

【目的】哺乳類の腸管には腸内細菌が共生しており、宿主の免疫系の発達や炎症制御反応に関与している。下部消化管である大腸は嫌気的環境であり上部消化管の小腸に比べ多くの腸内細菌が生息する一方で、食事性抗原は小腸で消化されるため届きにくく食物繊維や有機酸の多い環境である。このことから大腸は小腸と異なる特徴を有する免疫応答の場であることが示唆されるが、未解明な点が多い。本研究では、抗原レセプターを発現せずサイトカイン産生や転写因子発現の観点から T 細胞と類似のパターンを示し、免疫応答の極初期に働く細胞集団である自然リンパ球(innate lymphoid cells : ILCs)に着目した。今回は小腸・大腸の組織間で異なる割合を示した ILC2, ILC3 について解析した。ILC2 は転写因子 GATA3 を発現し IL-5, IL-13 を産生する細胞、ILC3 は転写因子 RoRγt を発現し IL-17A, IL-22 を産生する細胞として特定されている。
【方法】8~12 週齢の BALB/c マウスより小腸パイエル板(PP)、盲腸リンパ節(CeP)、結腸リンパ節(CoP)を摘出し、monensin 含有培地において PMA/ionomycin 刺激下で 6 時間培養した。そして培養後の細胞についてフローサイトメトリーにより、lineage marker(CD3, CD4, CD5, CD8, CD11b, CD11c, CD19, B220, IgD, IgM, TER-119, Fc$\varepsilon$RI$\alpha$, Gr-1)$^-$, CD25$^+$で特定される ILCs の転写因子発現および細胞内サイトカイン産生細胞割合、表面分子発現の解析を行った。
【結果・考察】PP の IL-17A$^+$ILCs は RoRγt を発現している一方で、CeP, CoP の IL-17A$^+$ILCs は RoRγt を発現しておらず GATA3 を発現し同時に IL-5 を産生していることがわかった。このことから大腸部位には IL-17A を産生する ILC2 が存在することが示され、大腸に特徴的な免疫応答に関与する可能性が考えられた。

gut immunity, innate lymphoid cells, colonic immune response

講演番号：3B10p12
講演日時：3 月 19 日 17:05～ B 校舎 10 会場

結腸リンパ節における T 細胞分化の特徴
Characteristics of T cell differentiation in colonic patches
○石濱 史也[1]、津田 真人[1]、小熊 俊生[1]、村木 悠平[1]、於 鉄崢[1]、八村 敏志[2]、高橋 宜聖[3]、高橋 恭子[1]、上野川 修一[1]、細野 朗[1]（[1]日大生資科、[2]東大院農生科・食の安全研セ、[3]感染研・免疫）
○Fumiya ISHIHAMA[1], Masato TSUDA[1], Toshiki OGUMA[1], Yuhei MURAKI[1], Tiezhenz YU[1], Satoshi HACHIMURA[2], Yosimasa TAKAHASI[3], Kyoko TAKAHASI[1], Shuichi KAMINOGAWA[1], Akira HOSONO[1] ([1]Nihon Univ., [2]Tokyo Univ, Research Center for Food Safety, [3]National Institute of Infectious Diseases, Dep.Immunology)

【目的】
腸管には生体最大の免疫系が存在しており、外界から侵入してくる病原微生物を選択的に排除している。また、腸管免疫系は食品成分や腸管に共生する莫大な数の腸内細菌を許容することで宿主の恒常性を維持している。小腸には腸管管腔内の抗原を積極的に取り込むパイエル板（PP）が存在し、抗原特異的な免疫応答の誘導を効率的に行っている。一方、大腸部位の盲腸と結腸にも PP と類似した構造を持つ盲腸リンパ節（CeP）、結腸リンパ節（CoP）が存在するがどのように免疫応答が行われているのか不明な点が多い。大腸には小腸に比べて膨大な種類と数の腸内細菌が存在し、生理的環境が異なることからもこれらのリンパ組織の免疫学的な特性が異なる可能性が考えられる。本研究では大腸部位に存在するリンパ節における免疫細胞の特徴およびその腸内細菌による影響を明らかにするために、$CD4^+$ T 細胞に着目した解析を行った。
【方法】
通常および無菌環境下で飼育した BALB/c マウス（8-12 週齢）から腸管関連リンパ組織である PP、CeP、CoP の細胞を調製し、フローサイトメトリーにより $CD4^+$ T 細胞の活性化状態と分化に関する細胞表面分子および細胞内転写因子の発現、および細胞内サイトカインの発現を解析した。
【結果】
各リンパ組織内の $CD4^+$ T 細胞の特徴を解析したところ、$CD44^{high}CD62L^{low}$ 活性化型 T 細胞の割合は PP と CoP 共に無菌マウスの方が通常マウスよりも低く、無菌マウスにおいては CoP の方が PP に比べて割合が有意に低かった。次に、分化したヘルパーT 細胞として誘導性制御性 T 細胞（$Neropilin\text{-}1^-Foxp3^+CD4^+$細胞）の発現について解析した結果、無菌マウスの CoP については通常マウスに比べて低値であったのに対して、PP では無菌マウスと通常マウスでは同程度であった。さらに、Th2 細胞（$IL\text{-}4^+CD4^+$細胞）の割合は、CoP においては、無菌マウスと通常マウスの間で同程度であったのに対して、PP では無菌マウスの方が通常マウスに比べて有意に高かった。以上のことから、CoP の T 細胞の活性や分化は主に腸内細菌に依存して誘導されるのに対して、PP の T 細胞は腸内細菌以外の要因によっても活性化や分化が誘導されている可能性があることが示唆された。

gut microbiota, T cell, colonic patch

講演番号：3B10p13
講演日時：3 月 19 日 17:20～ B 校舎 10 会場

# バイオグリコーゲンは腸管細胞への刺激を介してアレルギーを抑制する

# Enzymatically-synthesized glycogen inhibits type I allergy through stimulation of intestine.

○吉岡 泰淳[1]、古屋敷 隆[2]、芦田 均[3] ([1]神戸大院・科技イノベ、[2]江崎グリコ（株）・健康科学研究所、[3]神戸大院・農)
○ Yasukiyo YOSHIOKA[1], Takashi FURUYASHIKI[2], Hitoshi ASHIDA[3] ([1]Grad. Sch. of Sci. Technol. Innov., Kobe Univ., [2]Insutite of Health Sci., Ezaki Glico Co., Ltd., [3]Grad. Sch. of Agr. Sci., Kobe Univ.)

【目的】

バイオグリコーゲン（ESG）は、食物繊維様作用や大腸炎の予防、皮膚への UV ダメージを抑制することが報告されている。われわれは、ESG が、腸管細胞 Caco-2 細胞とマクロファージ様細胞 Raw264.7 細胞の共培養系において、免疫賦活作用を有することを明らかにしてきた。そこで本研究では、Caco-2 細胞と好塩基球系 RBL-2H3 細胞の共培養系を用いて、I 型アレルギーに対する効果について検討することとした。

【方法】

RBL-2H3 細胞に Monoclonal anti-dinitrophenyl (DNP) IgE 抗体を 16 時間感作させた。ESG を 15 分間処理し、抗原として DNP-bovine serum albumin (DNP- BSA) で 1 時間刺激した。また、ESG を 15 分間処理した後に、PKC 活性化剤 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) とカルシウムイオノフォア A23187 で 1 時間刺激した。それらの培養上清に含まれるヒスタミンの指標である β-hexosaminidase 量を比色法にて測定した。さらに、ESG を 24 時間処理し、抗体抗原反応を誘導し、β-hexosaminidase 放出量を測定した。最後に、トランズウェルを用いて、管腔側に Caco-2 細胞、基底膜側に RBL-2H3 細胞を播種した共培養系にて評価した。ESG を Caco-2 細胞に 24 時間処理し、基底膜側に抗体を 16 時間感作させた。その後、基底膜側に抗原 DNP- BSA を 1 時間刺激し、上清に含まれる β-hexosaminidase 量を測定した。

【結果】

ESG の 24 時間処理は、RBL-2H3 細胞における抗原抗体反応を介した β-hexosaminidase 放出を有意に抑制した。しかしながら、PMA および A23187 で刺激したものでは、抑制はみられなかった。また、ESG の 15 分間処理においても、抑制効果はみられなかった。最後に、ESG は、トランズウェルを用いた共培養系において、RBL-2H3 細胞からの β-hexosaminidase 放出を抑制した。

【結論】

ESG は、腸管細胞への刺激を介して、I 型アレルギーを抑制することが示唆された。現在は、ESG の I 型アレルギーの抑制機構について詳細な検討を行っている。

glycogen, ESG, allergy

講演番号：3B10p14
講演日時：3 月 19 日 17:35～ B 校舎 10 会場

経口免疫寛容における抗原特異的濾胞性ヘルパーT 細胞の解析
Analysis of antigen-specific follicular helper T cells in oral tolerance
○芝原 恭子[1,2]、高橋 宜聖[3]、八村 敏志[1,4] ([1]東大院農生科・食の安全研セ、[2]日本学術振興会特別研究員、[3]感染研・免疫、[4]東大院農生科・応生化)
○Kyoko SHIBAHARA[1,2], Yoshimasa TAKAHASHI[3], Satoshi HACHIMURA[1,4] ([1]Res. Cent. Food Safety, Univ. Tokyo, [2]JSPS Research Fellow, [3]Dept. Immunol., Natl. Inst. Inf. Dis., [4]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. Tokyo)

【背景】 経口免疫寛容とは、経口的に摂取した抗原に対する免疫応答が低応答化する現象であり、食物アレルギーの抑制機構であると考えられている。経口免疫寛容の誘導には抗原特異的 T 細胞が必要であるが、その機能解析は十分ではない。これまでに我々は、経口免疫寛容誘導時の抗原特異的 T 細胞において、抗体産生に関わる T 細胞のサブセットである、濾胞性ヘルパーT 細胞(Tfh 細胞)が誘導されることを報告した。しかしながら、Tfh 細胞が経口免疫寛容の誘導に寄与するのかは明らかでない。そこで本研究では、経口免疫寛容状態と、免疫アジュバントを用いて免疫系を活性化した状態との比較を行うことで、経口免疫寛容に伴って誘導された Tfh 細胞の特徴を明らかにすることを目指した。
【方法】 Rag2KO/DO11.10 マウスから調製した卵白アルブミン(OVA)特異的 $CD4^+$T 細胞を、尾静脈より野生型マウスに移入した。移入の翌日より 1 日置きに 3 回、コレラトキシン(CT)、OVA もしくは CT と OVA を同時に経口投与し(以下、それぞれ CT 群、OVA 群、CT/OVA 群とする)、最後の免疫から 3 日後に解析を行った。パイエル板 $CD4^+$T 細胞を OVA および抗原提示細胞の存在下で培養し、培養上清中のサイトカイン産生量を ELISA 法によって測定した。血清および空腸組織抽出液中の OVA 特異的抗体量を ELISA 法により測定した。フローサイトメトリーを用い、脾臓、腸間膜リンパ節およびパイエル板における $CD4^+$T 細胞中の Rag2KO/DO11.10 マウス由来細胞を検出し、$CXCR5^+PD\text{-}1^+$細胞を Tfh 細胞とした。
【結果】 パイエル板 $CD4^+$T 細胞を OVA で刺激したとき、培養上清中のサイトカイン産生量を測定すると、CT 群と比較して OVA 群、CT/OVA 群で IL-2 の産生量が低下する一方、CT/OVA 群でのみ IL-4 の産生が認められた。以上の結果から、OVA 群では経口免疫寛容が誘導され、一方 CT/OVA 群では OVA に対する免疫応答が促進し、経口免疫寛容の誘導が阻害されていることが示唆された。続いて、各群の血清中の OVA 特異的 IgG 抗体量、空腸組織抽出液中の OVA 特異的 IgA 抗体量を測定すると、どちらも OVA 群と比較して CT/OVA 群で有意に増加していた。そこで、脾臓、腸間膜リンパ節、パイエル板において $CD4^+$T 細胞中の Rag2KO/DO11.10 マウス由来 Tfh 細胞の割合を解析すると、脾臓およびパイエル板において、OVA 群と比較して CT/OVA 群で有意に割合が上昇していた。以上のことから、経口免疫寛容における Tfh 細胞の誘導は免疫の活性化時と比べて微弱であり、過度な抗体産生が抑制されている可能性が考えられる。

oral tolerance, follicular helper T cell, immune response

講演番号：3B10p15
講演日時：3 月 19 日 17:50～ B 校舎 10 会場

# 低分子量 GTP アーゼを介した腸管上皮透過性の調節機構

# Small GTPase-mediated regulation of intestinal epithelial permeability

○中田 一彰、高橋 恭子、杉 由高、小早川 哲朗、楢林 ひかり、松尾 大介、牛島 直哉、津田 真人、細野 朗、上野川 修一、花澤 重正（日本大学生物資源科学部）
○ Kazuaki NAKATA, Kyoko TAKAHASHI, Yutaka SUGI, Tetsuro KOBAYAKAWA, Hikari NARABAYASHI, Taisuke MATSUO, Naoya USHIJIMA, Masato TSUDA, Akira HOSONO, Shuichi KAMINOGAWA, Shigemasa HANAZAWA (Nihon Univ.)

［目的］

これまでの多くの研究により、腸内細菌が宿主の生理機能に重要な役割を果たすこと、腸内細菌叢のバランスの破綻は炎症性腸疾患や生活習慣病等の発症に関与することが報告されている。そのため、腸内細菌と宿主細胞の相互作用について解析することは、疾患の予防・治療のための標的分子の同定につながると考えられる。これまでに、腸内細菌により腸管上皮細胞 (IEC) において miR-21-5p の発現が誘導され、この miRNA が上皮透過性の調節に関与することを報告した。さらに、その標的候補分子として低分子量 GTP アーゼである ADP-ribosylation factor (ARF) 4 を同定した。そこで、本研究では IEC における ARF4 の発現と機能について解析を行った。

［方法］

通常および無菌の雌性 BALB/c マウス(10-12 週齢)の小腸と大腸から IEC を調製し、ARF4 の発現をウェスタンブロッティングにより解析した。この時、小腸は 5 分割して胃側（近位）、中央（中位）、盲腸側（遠位） の 3 箇所を部位別に解析した。次に、ヒト IEC 株 Caco-2 を Transwell インサート膜上に播種し、ARF4 またはコントロールの siRNA を導入した。その後、継時的に経上皮電気抵抗 (TER) 値を測定した。また、細胞を回収してウェスタンブロッティングにより ARF4 の発現の抑制を確認するとともに、タイトジャンクション関連タンパク質の発現を解析した。

［結果］

IEC における ARF4 の発現を解析した結果、大腸において無菌マウスと比較して通常マウスで発現が高いことが確認された。したがって、大腸 IEC における ARF4 の発現が腸内細菌により増大されることが示された。一方、小腸 IEC の ARF4 の発現は、腸内細菌の影響を顕著に受けないことが確認された。次に、Caco-2 に ARF4 の siRNA を導入することにより ARF4 の発現が抑制されることが確認され、コントロールの siRNA を導入した場合と比べて TER 値が有意に増加した。さらに、この時 Claudin-4 の発現が上昇することが明らかになった。以上の結果から、まず、ARF4 は miR-21-5p の直接のターゲットではないが腸内細菌によりこの miRNA 依存的に発現が正に制御されると考えられた。そして、miR-21-5p による腸管上皮透過性の制御は ARF4 を介することが示唆された。

intestinal epithelial cell, tight junction, small GTPase

発表責任者：高橋恭子（ktaka@brs.nihon-u.ac.jp）

講演番号：3B10p16
講演日時：3 月 19 日 18:05～ B 校舎 10 会場

# 消化管上皮の亜鉛トランスポーターZIP5 の発現制御解析と消化管バリア機能への役割

# Analysis of expression control of ZIP5 in intestinal epithelium and its role in intestinal barrier function

○松尾 樹[1]、神戸 大朋[2]、鈴木 卓弥[1] ([1]広島大院・生物圏科学、[2]京大院・生命・統合生命科学)
○Tatsuki MATSUO[1], Taiho KAMBE[2], Takuya SUZUKI[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]Kyoto Univ.)

【背景・目的】必須微量元素である亜鉛は、多様な生命現象に重要な役割を持つことが知られ、さらに近年の研究により消化管の恒常性の維持にも関わることが報告されている。細胞内の亜鉛濃度は複数の亜鉛トランスポーターによって制御されており、その発現異常は細胞の機能障害を誘導し、種々の疾患に繋がりうることが推測される。私たちの先行研究において、消化管上皮における細胞内亜鉛が消化管バリアの維持に必須な役割を持つこと、大腸炎マウスの病変部位では各種亜鉛トランスポーターのうち、上皮細胞の基底膜に局在して血液側から細胞内に亜鉛を取り込む ZIP5 の発現が特異的に低下していることが見出されている。これらの実験的事実より ZIP5 は大腸上皮の細胞内亜鉛とバリアの恒常性に一定の役割をもち、その発現低下は大腸の炎症惹起にも関わることが提案される。そこで本研究は、大腸の恒常性維持における ZIP5 の役割を明らかにする一環として、まずヒト消化管上皮 Caco-2 細胞を用いて ZIP5 の発現を低下させる炎症性要因とその作用機構を解析した。続いて Doxycycline によってマウス ZIP5 の発現を誘導できる ZIP5-HA MDCK 細胞を用いて、上皮バリア機能制御における ZIP5 の保護的役割を探索した。

【方法・結果】炎症惹起に関わる種々の刺激に Caco-2 細胞を暴露したところ、酸化ストレス（過酸化水素、H2O2）刺激が ZIP5 の mRNA 量を低下させた（qPCR 法）。また、ヒト ZIP5 プロモーター配列をクローニングし、H2O2 によるプロモーター活性への影響を探索したところ、H2O2 は濃度依存的に ZIP5 プロモーター活性を低下させた。さらに、プロモーター配列の変異体を構築することにより、ZIP5 の転写活性制御と H2O2 によるその低下には、転写開始点上流の 976 から 496 bp の配列領域が深く関わることが示された。続いて、ZIP5-HA MDCK 細胞に亜鉛キレート試薬 TPEN を作用させ、細胞内亜鉛を欠乏させたところ、亜鉛欠乏によって上皮バリア機能の指標である経上皮電気抵抗値（TER）の低下およびタイトジャンクション（TJ）タンパク質 Occludin と Claudin-3 発現の低下が確認されたが（イムノブロット法）、Doxycycline 添加による ZIP5 の発現誘導はそれら低下を軽減した。さらに、亜鉛欠乏下では TNF-αによる TER 低下作用が増強されたが、ZIP5 の発現誘導はその低下作用を軽減した。

【考察・結論】消化管上皮の ZIP5 発現が酸化ストレスによって低下することが見出され、それは転写レベルで制御されることが示唆された。また、上皮の ZIP5 発現が TJ バリア制御に保護的に寄与しうる可能性も提案された。

Zinc Trasporter, Tight Junction, Oxidant Stress

講演番号：3C11a01
講演日時：3 月 19 日 09:20～ C 校舎 11 会場

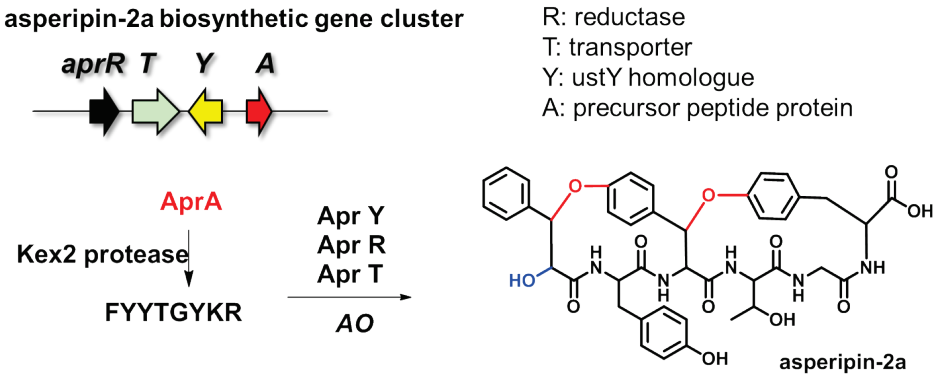
# Heterologous production of a fungal RiPP asperipin-2a

○Ying Ye[1], Taro Ozaki[2], Atsushi Minami[2], Yuya Igarashi[1], Myco Umemura[4], Masayuki Machida[4], Miho Izumikawa[5], Kazuo Shin-ya[5], Katsuya Gomi[3], Hideaki Oikawa[2] ([1]Graduate School of Chemical Science and Engineering, Hokkaido Univ., [2]Graduate School of Science, Hokkaido Univ., [3]Graduate School of Agricultural Science, Tohoku Univ., [4]Bioproduction Research Institute, AIST, [5]Biomedicinal Information Research Center, JBIC)

**[Background]** Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs) is a rapidly growing class of natural products found in archaea, bacteria and eukaryotes. Although the biosynthesis of bacterial RiPPs has been intensively studied[1], biosynthesis of fungal RiPPs remains less well understood. Recently, ustiloxin B was identified as the first RiPP produced by filamentous fungi[2], and its biosynthetic pathway was elucidated[3]. Particularly, UstA, a precursor protein, and oxidative cyclase UstYa/Yb were proven to be essential for formation of ustiloxin macrocyclic scaffold by heterologous expression in *Aspergillus orzyae*. Furthermore, genome mining of UstA and UstY homologues revealed the wide distribution of these proteins and led to the discovery of asperipin-2a produced by *Aspergillus flavus*[4]. Although biosynthetic gene cluster of asperipin-2a was predicted by gene disruption and expression analysis of producing strain[4], further study on asperipin-2a cyclization mechanism is required.

**[Results and discussion]** In this study, biosynthetic pathway of asperipin-2a was reconstituted in *A. oryzae*. Transformation of plasmids harboring putative biosynthetic genes into *A. oryzae* enabled us to isolate asperipin-2a from transformants. The results showed that a precursor protein AprA, a putative oxidative cyclase AprY and a short chain reductase AprR were required for asperipin-2a formation. Similar to the biosynthesis of ustiloxin B, AprY is hypothesized to catalyze oxidative cyclization. Our finding proved the importance of UstY homologues in the fungal RiPPs biosynthesis.

**[References]** [1] *Nat. Prod. Rep.*, **2013**, *30*, 108. [2] *Fungal Genet. Biol.*, **2014**, 68, 23. [3] *Angew Chem Int Ed.*, **2016**, 55, 8072. [4] *Fungal Genet. Biol.*, **2016**, 86, 58.



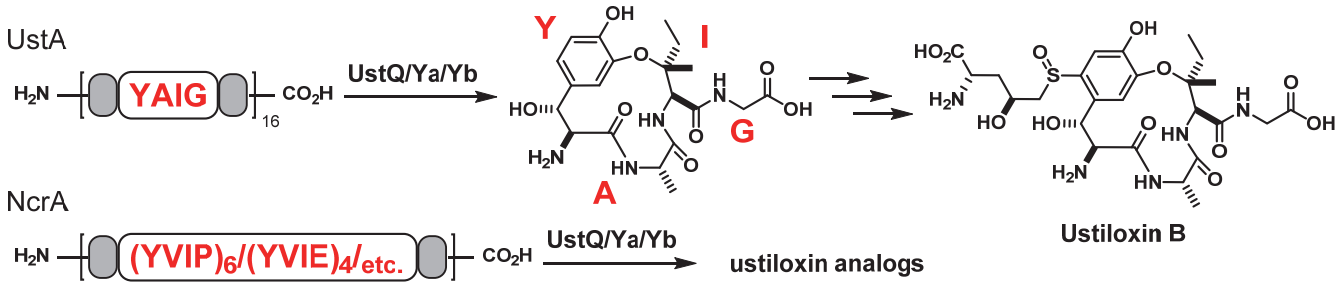

fungal RiPPs, heterologous expression, biosynthesis

講演番号：3C11a02
講演日時：3 月 19 日 09:35～ C 校舎 11 会場

# ustiloxin 系糸状菌 RiPPs のゲノムマイニング
# genome mining of ustiloxin type fungal RiPPs

○五十嵐 祐也[1]、叶 英[1]、尾﨑 太郎[2]、南 篤志[2]、五味 勝也[3]、及川 英秋[2] ([1]北大院総化、[2]北大院理、[3]東北大院農)
○Yuya IGARASHI[1], Ying YE[1], Tarou OZAKI[2], Atsushi MINAMI[2], Katsuya GOMI[3], Hideaki OIKAWA[2] ([1]Hokkaido Univ. Grad. Sch. Che. Sci. Eng., [2]Hokkaido Univ. Grad. Sch. Sci., [3]Tohoku Univ. Grad. Sch. Agr. Sci.)

【目的・背景】Ustiloxin 類は稲こうじ病菌から単離されたマイコトキシンであり、エーテル結合を介したユニークな 13 員環を有する環状ペプチドである。近年、*Aspergillus flavus* において ustiloxin B の生合成遺伝子クラスター（*ust* クラスター）が同定され、本化合物がリボソームを介して生合成される RiPPs (Ribosomally synthesized and Posttranslationally modified Peptides)であることが明らかになった[1)]。また、*ust* クラスターの発見を契機として、類似の遺伝子群が糸状菌に数多く見出されており[2)]、新たな生物活性物質の探索源として着目されている。本研究では、ゲノムマイニングにより見出した新たな RiPPs 生合成遺伝子群の機能解析について報告する。
【方法・結果】ゲノムマイニングにより、*Neurospora crassa* のゲノム上に RiPPs 生合成遺伝子クラスター（*ncr* クラスター）を見出した。我々はこれまでに ustiloxin B の前駆体ペプチド UstA の環化にチロシナーゼである UstQ と二つの機能未知酵素 UstYa/Yb が関与することを麹菌異種発現系を用いて明らかにしてきたが[3)]、 *ncr* クラスター中にこれらのホモログが見出されたことから、*ncr* クラスターが ustiloxin 類縁化合物の生合成に関与すると推測した。UstA においては ustiloxin の構造に対応した YAIG というテトラペプチドが 16 回繰り返した配列が見出されるが、今回見出した前駆体ペプチド NcrA においては YVIP や YVIE など 5 種類の繰り返し配列が見られた。麹菌異種発現系を用いて UstQ、UstYa/Yb による NcrA の変換を試みたところ、最も多く見出される YVIP の配列に対応したテトラペプチドの生産を確認することができた。現在、YVIE 等他の繰り返し配列に対応したペプチドの生産確認、単離・精製も進めている。また、*ncr* クラスター中には他にも修飾酵素が見出されることから、それらの機能解析も進めている。




1) Umemura, M. *et al.*, *Fung. Genet. Biol.* **2014**, *68*, 23-30. 2) Nagano, N. *et al.*, *Fung. Genet. Biol.* **2016**, *86*, 58-70. 3) Ying Ye. *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 8072-8075.

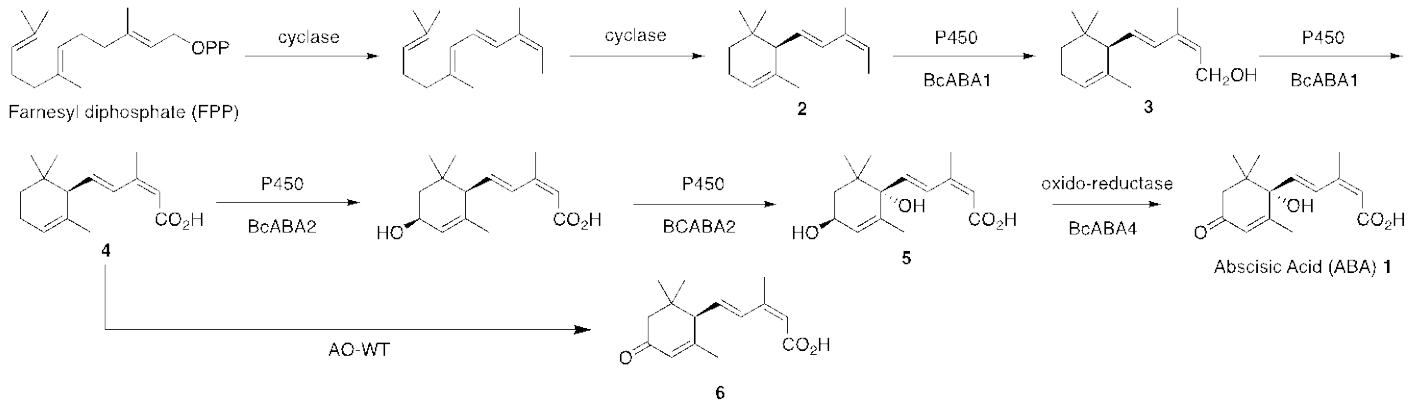
Natural product, Biosynthesis, RiPPs

講演番号：3C11a03
講演日時：3 月 19 日 09:50～ C 校舎 11 会場

麹菌異種発現系を用いた Abscisic Acid の生合成研究（3）
Biosynthetic study of Abscisic Acid utilizing *Aspergillus oryzae* heterologous expression system(3)
○小崎 拓登[1]、南 篤志[2]、五味 勝也[3]、及川 英秋[2] ([1]北大院総化、[2]北大院理、[3]東北大院農)
○Takuto KOZAKI[1], Atsushi MINAMI[2], Katsuya GOMI[3], Hideaki OIKAWA[2] ([1]Grad. Sch. Chem. Sci. and Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Sci., Hokkaido Univ., [3]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

【背景・目的】Abscisic Acid(ABA, **1**)は全ての植物及び一部の植物病原性糸状菌によって生産される植物ホルモンであり、植物の休眠や成長抑制を行う物質である。**1** は炭素数 15 の化合物であるが、植物では炭素数 40(C40)のカロテノイドを経由し、切り出されることで生合成されることが知られている。一方糸状菌では C15 のファルネシルニリン酸から直接生合成されると考えられており、その生合成機構の違いに関して大きな興味が持たれている。遺伝子破壊実験から生合成後期の酸化的修飾を行う遺伝子群が発見されていたものの、生合成経路に関する知見は得られていなかった。昨年度の本会において、ABA 生産菌 *Botrytis cinerea* の酸化酵素 P450(BcABA1・BcABA2)と酸化還元酵素(BcABA4)を麹菌に同時導入し、その形質転換体を用いた微生物変換により、**2** から **1** への変換を確認したことについて報告した。そこで今回は単独導入株を用いることで各酵素の詳細な機能解析を行った。
【方法・結果】BcABA1 及び 2 について麹菌異種発現系による単独発現株を調製し、それらを用いた微生物変換を行った。基質として **2** を用いたところ、BcABA1 単独発現株において **4**, **6** の生産を確認した。また基質として **4** を用いたところ、BcABA2 単独発現株において **1**, **5**, **6** の生産を確認した。更に BcABA4 については組み換え酵素を調製することで *in vitro* での酵素反応を行い、**5** から **1** への酸化反応を確認した。これらの結果より BcABA1 は側鎖メチル基の 3 段階酸化を、BcABA2 は環内アリル位の 2 段階酸化を、BcABA4 は環内アルコールをケトンへと酸化する機能を持つことを明らかにし、ABA の生合成後期における酸化修飾反応の経路を同定した。

＜予想生合成経路＞




Abscisic Acid, Biosynthesis, Heterologous expression

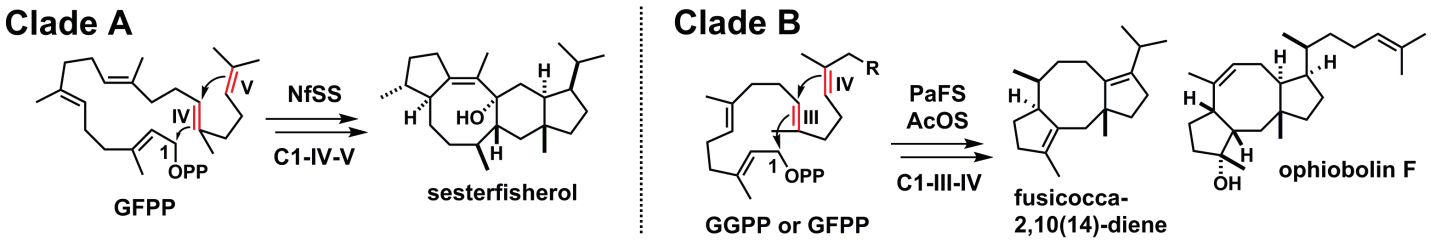
発表責任者：小崎拓登（takufaru@eis.hokudai.ac.jp）

講演番号：3C11a04
講演日時：3 月 19 日 10:05～ C 校舎 11 会場

麹菌発現系を利用した構造類似テルペンの網羅的ゲノムマイニング
Genome mining of structural similar terpenoids using by Aspergillus oryzae heterologous expression system

○成田 興司[1]、工藤 洸星[1]、叶 英[1]、南 篤志[2]、児玉 基一郎[3]、五味 勝也[4]、及川 英秋[2]([1]北大院総化、[2]北大院理、[3]鳥取大院農、[4]東北大院農)
○Koji NARITA[1], Kosei KUDO[1], Ying YE[1], Atsushi MINAMI[2], Motoichiro KODAMA[3], Katsuya GOMI[4], Hideaki OIKAWA[2] ([1]Hokkaido Univ. Grad. Sch. Sci. Eng., [2]Hokkaido Univ. Grad. Sch. Sci., [3]Tottori Univ. Grad. Sch. Agr., [4]Tohoku Univ. Grad. Sch. Agr. Sci.)

【目的】天然において糸状菌は多種多様な生物活性テルペノイドを生産している。我々は以前から麹菌異種発現システムを用いてテルペン環化酵素遺伝子の機能解析を行うことで、新規テルペノイドのゲノムマイニングを試みてきた。炭素鎖の伸長ドメインと環化ドメインが融合した二機能性テルペン環化酵素をターゲットとして探索を行った結果、糸状菌 *Aspergillus clavatus*, *Neosartorya fischeri* からそれぞれ ophiobolin F 生合成酵素(AcOS)および sesterfisherol 生合成酵素(NfSS)を見出した[1,2]。これらの環化酵素遺伝子は系統樹解析によって複数のクレードに分類することができ、NfSS が属するものをクレード A、AcOS と fusicoccadiene 合成酵素(PaFS)が属するものをクレード B とした。これにより、環化酵素遺伝子の相同性と環化様式との間には相関があることが示唆され、同じクレードに属する環化酵素はよく似た化合物を生産すると予想された。そこで本研究では、NfSS のみしか機能解析されていないクレード A に着目し、これに属する複数の環化酵素遺伝子について網羅的に機能解析を行うことで、その環化様式についてより詳細に調べることとした。
【方法・結果】糸状菌ゲノム情報から NfSS のホモログを探索したところ、*Bipolaris maydis* などから計 4 種の候補遺伝子が見出された。麹菌発現系によりこれらの機能解析を行ったところ、新規化合物 4 種の生産が確認され、構造解析の結果これらは sesterfisherol とよく似た骨格を持つことが分かった。また、これらは sesterfisherol 生合成経路中の中間体から分岐して生成したものであることが示唆された。さらに、未だ機能解析されていない新規クレードに属する環化酵素遺伝子についても同様に機能解析を行っており、これらからもテルペン環化体の生産が確認された。本発表では、これら生合成経路の詳細や環化様式について得られた知見について報告する。




1) Chiba, R.; Minami, A.; Gomi, K.; Oikawa, H. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 594.
2) Ye, Y.; Minami, A.; Mandi, A.; Liu, C.; Taniguchi, T.; Kuzuyama, T.; Monde, K.; Gomi, K. Oikawa, H. *J.Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 11846.

terpenoid, biosynthesis, genome mining

講演番号：3C11a05
講演日時：3 月 19 日 10:20～ C 校舎 11 会場

# 麹菌異種発現系を用いた PKS-NRPS 由来天然物の生合成研究

# Biosynthetic study of fungal PKS-NRPS metabolites using Heterologous expression system

○劉 成偉[1]、山根 桃華[2]、尾崎 太郎[1]、南 篤志[1]、及川 英秋[1] ([1]北大院理、[2]北大院総化)
○Chengwei LIU[1], Momoka YAMANE[2], Taro OZAKI[1], Atsushi MINAMI[1], Hideaki OIKAWA[1]
([1]Grad. Sch. Sci., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Chem. Sci. and Eng., Hokkaido Univ)

【目的】糸状菌が生産するハイブリッド酵素（PKS-NRPS）により構築される天然物の多くは、3-アシル基が置換したテトラミン酸もしくはピロリノン骨格を持つ鎖状中間体を経由して生合成される。前者は、骨格構築酵素 PKS-NRPS の末端に位置する還元ドメインの作用により構築されることが、tenellin や didymellamide の生合成研究で明らかにされている。一方、後者の生合成機構については不明な点が多い。例えば、*Fusarium fujikuroi* が生産する fusarin C は、４つの遺伝子（*fus1*, *fus2*, *fus8*, *fus9*）により生合成されることが報告されているが[1)]、2−ピロリノン環の形成に関する酵素の同定には致っていない。本研究では麹菌異種発現系を利用して４遺伝子の機能解析を行った。

【方法・結果】 Fusarin C 生産菌の一種である *Gibberella fujikuroi* からゲノム DNA を抽出し、PKS-NRPS を含む４遺伝子をクローニングした。これらの遺伝子を麹菌へと導入し、得られた形質転換体 (*AO-fus1*; *AO-fus1/2/8/9*)の代謝産物を解析した。LC-MS および NMR により、PKS-NRPS (AO-*fus1*)の単独発現株からは、直鎖状中間体と予測される化合物存在が確認された。４重形質転換体 (AO-*fus1/2/8/9*) からは、先の化合物と異なる保持時間に Fusarin C と類似した UV スペクトルを持ついくつかの新しいピークが観測された。現在これらの代謝産物の構造決定を行っている、その詳細を報告する。

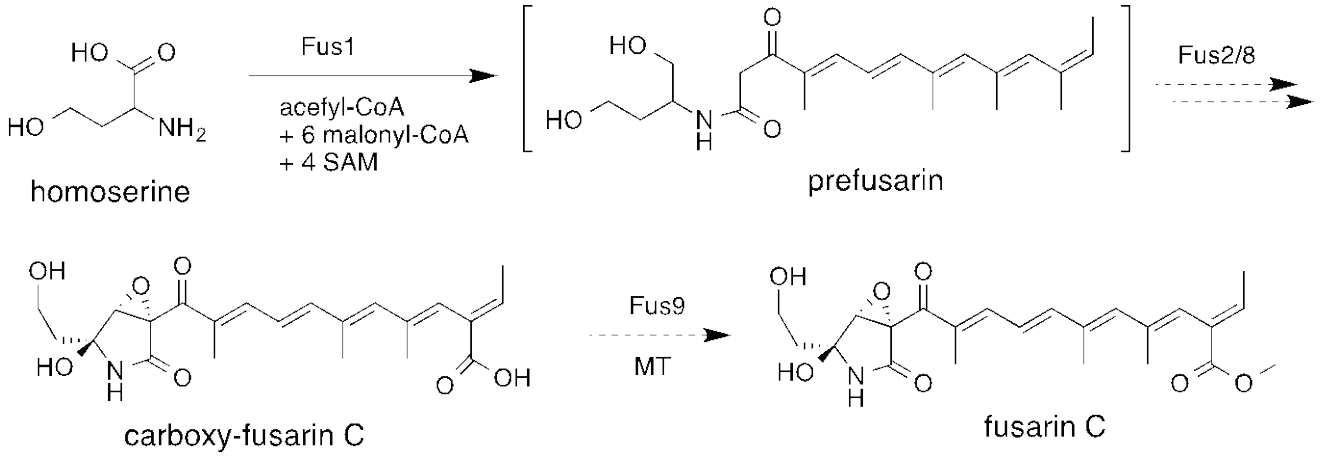



図１：推定 fusarun C 生合成経路[1)]

1) E. M. Niehaus, *et al*. *Chem Biol*. **2013**, *20*, 1055-66.

PKS-NRPS, Heterologous expression, Polyketide

講演番号：3C11a07
講演日時：3 月 19 日 11:00～ C 校舎 11 会場

病原菌感染や植物ホルモン処理がイネにおけるフェニルアミド類の蓄積に及ぼす影響
Effects of pathogen infection and treatment with plant hormones on accumulation of phenylamides in rice.

○森本 紀子[1]、上野 琴巳[2]、寺石 政義[3]、奥本 裕[3]、森 直樹[3]、石原 亨[2] ([1]鳥取大院農、[2]鳥取大農、[3]京大院農)
○Noriko MORIMOTO[1], Kotomi UENO[2], Masayoshi TERAISHI[3], Yutaka OKUMOTO[3], Naoki MORI[3], Atsushi ISHIHARA[2] ([1]Grad. Sch. Agric., Tottori Univ., [2]Fac. Agric., Tottori Univ., [3]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【目的】

植物は病原菌感染や昆虫による食害といった様々なストレスに応答し、ヒドロキシ桂皮酸類と生体アミンから構成されるフェニルアミドを生成・蓄積する。我が国の主要作物であるイネでも、紫外線照射や病原菌感染によって 4 種のフェニルアミド（シンナモイルトリプタミン、シンナモイルチラミン、p-クマロイルセロトニン、ベンゾイルトリプタミン）が誘導されることが報告されている。しかし、フェニルアミドの生物学的重要性や誘導のメカニズムなどには不明な点も多い。そこで、本研究ではフェニルアミドについて新たな知見を得ることを目的とし、病原菌感染や植物ホルモン処理がフェニルアミドの蓄積に及ぼす影響を調べた。

【方法および結果】

桂皮酸、*p*-クマル酸、カフェー酸、フェルラ酸、および安息香酸を *N*-ヒドロキシスクシニイミドエステルとし、トリプタミン、セロトニン、チラミン、アグマチン、プトレシンの 5 種のアミンと反応させ、合計 25 種類のフェニルアミドを合成した。得られた化合物を標準化合物として、LC-MS/MS の MRM による一斉分析法を確立した。イネ（品種、日本晴）を播種後 2 週間生育させ、第 3 葉にイネごま葉枯病菌（*Bipolaris oryzae*）およびイネ白葉枯病菌（*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*）を接種した。一定時間後に 80%メタノールで抽出し、フェニルアミド類を LC-MS/MS を用いて定量した。また、第 3 葉を 1 cm 幅に切断し、1 mM のジャスモン酸溶液に浮かべた。一定時間後、葉を抽出し、フェニルアミド類を定量した。

ごま葉枯病菌を接種した場合には、フェルロイルプトレシン、ベンゾイルトリプタミン、ベンゾイルセロトニンなど 12 種類のフェニルアミドの蓄積量が増加した。一方、白葉枯病菌を接種すると、コントロールに比べ、多くのフェニルアミド類の蓄積量が減少した。したがって、フェニルアミドの合成は病原菌の種類によって異なる制御を受けていることが判明した。

また、多くのフェニルアミドは、葉を切り取って蒸留水に浮かべるだけで蓄積量が増加した。さらに、ジャスモン酸はフェニルアミドの蓄積を抑制する傾向を示した。したがって、フェニルアミドは傷害ストレスによって誘導されるものの、ジャスモン酸はその誘導に主要な役割を果たしていないことが示唆された。

rice, phenylamide, infection

発表責任者：石原亨（aishihara@muses.tottori-u.ac.jp）

講演番号：3C11a08
講演日時：3 月 19 日 11:15～ C 校舎 11 会場

# 一アミノ酸置換によるメバロン酸 3-キナーゼのジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼへの変換
# Conversion of mevalonate 3-kinase into diphosphomevalonate decarboxylase by a single amino acid substitution

○本山 賢人、吉村 徹、邊見 久 (名大院生命農)
○Kento Motoyama, Tohru Yoshimura, Hisashi Hemmi (Nagoya Univ.)

最大の天然有機化合物群であるイソプレノイドには、呼吸鎖キノンやステロイドホルモンなどの生命活動に重要な化合物が含まれる他、天然ゴムや香料などの産業上重要な物質や、抗マラリア薬であるアルテミシニンの様な有用二次代謝産物が多く含まれる。これらは総じて、炭素数 5 の活性イソプレン単位であるイソペンテニル二リン酸（IPP）及びジメチルアリル二リン酸から生合成されており、生体内におけるそれら前駆体の供給源の一つにメバロン酸（MVA）経路が知られている。

近年、古典的 MVA 経路の一部酵素が置換され、異なる中間体を経由する変形 MVA 経路が一部の古細菌や真正細菌から見出されている。最近我々は、そのような変形経路の構成要素として、好熱性古細菌 *Thermoplasma acidophilum* から新奇酵素メバロン酸 3-キナーゼ（TacM3K）を同定した。同酵素は、古典的 MVA 経路中の酵素の一つであるジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ（DMD）に配列相同性を有するが、両酵素が触媒する反応は大きく異なっている。DMD の触媒反応では、先ず基質であるメバロン酸-5-二リン酸（MVA5PP）の 3 位水酸基が ATP を用いてリン酸化される。その後、3 位リン酸基の脱離に伴った脱炭酸反応が起こり、IPP が生じる。これに対し、TacM3K の触媒反応では MVA が基質となり、その 3 位水酸基がリン酸化されてメバロン酸-3-リン酸が生じる。しかし DMD 反応とは異なり、その後のリン酸基の脱離及びそれに付随する脱炭酸反応は起こらない。この様な触媒反応の違いが生じる原因を探るため、TacM3K および好熱性古細菌 *Sulfolobus solfataricus* 由来 DMD（SsoDMD）の X 線結晶構造における活性部位の比較を行ったところ、TacM3K では基質である MVA の 5 位水酸基と近接する位置に Glu140 が存在するのに対し、SsoDMD の対応する位置には Gly140 が存在していた。このことから、基質の 5 位に近接するアミノ酸残基が規定する空間的な広さの差が、DMD ホモログ酵素の基質認識に寄与することが予想された。

そこで我々は、TacM3K の Glu140 変異体を構築し、放射性基質と TLC を用いた機能解析、及び ESI-MS と 13C-NMR を用いた生成物解析を行った。その結果、一部の TacM3K 変異体に MVA5PP を基質として認識させ、さらに DMD 活性を付与する事に成功した。この結果は、同変異体の脱炭酸反応に MVA5PP の 5 位二リン酸基が寄与していることを示唆している。現在、同変異体酵素の速度論解析を試みており、その結果についても合わせて報告したい。

Mevalonate pathway, Isoprenoid, Kinase

発表責任者：本山賢人（motoyama.kento@f.mbox.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3C11a09
講演日時：3 月 19 日 11:30～ C 校舎 11 会場

# 非メバロン酸経路の中間体をドナー基質としたプレニル基転移酵素の反応

# Prenyltransferase reaction with a non-mevalonate pathway intermediate as the donor substrate

○林 佳史、伊藤 智和、吉村 徹、邊見 久（名大院生命農）
○Yoshifumi Hayashi, Tomokazu Ito, Tohru Yoshimura, Hisashi Hemmi (Nagoya Univ.)

プレニル基転移酵素は、イソプレノイドの生合成に深くかかわる酵素群である。それらは一般に、ドナー基質であるプレニル二リン酸からのリン酸基の脱離と、それに伴うアクセプター基質の求核攻撃を触媒することにより、それらの縮合生成物を合成する。プレニル基のドナー基質としてもっとも単純な構造を持つ化合物はジメチルアリル二リン酸（DMAPP）であり、異性体のイソペンテニル二リン酸（IPP）とともに、真核生物やアーキア、一部のバクテリアではメバロン酸（MVA）経路によって、多くのバクテリアでは非メバロン酸経路とも呼ばれる 2-メチルエリスリトール 4-リン酸（MEP）経路によって合成される。MEP 経路において、IPP と DMAPP の直接の前駆体は 4-ヒドロキシ-3-メチル-2-ブテニル二リン酸（HMBPP）である。

本研究では、バクテリアの一種である *Corynebacterium glutamicum* のもつプレニル基転移酵素、CrtEb に着目した。同酵素は、C40 カロテノイドであるリコペンの両端への DMAPP の縮合、およびその末端の水酸化を触媒し、C50 カロテノイドであるフラブキサンチンの生成を触媒するとされている。しかし我々は、*C. glutamicum* が MEP 経路をもつことから、CrtEb のドナー基質は DMAPP ではなく、HMBPP なのではないかと予想した。CrtEb を含む複数酵素を異種発現させた C50 カロテノイド生産大腸菌を用いた実験により、CrtEb が HMBPP をドナー基質として用いていることを示唆する結果を得たので報告する。

さらに我々は、CrtEb とは異なるファミリーのプレニル基転移酵素である全トランス型プレニル二リン酸合成酵素を用いて研究を進めた。同酵素群は、DMAPP または短鎖の全トランス型プレニル二リン酸をドナー基質として、それらに IPP を連続的に縮合させ、より長鎖の全トランス型プレニル二リン酸の合成を触媒する。本研究で我々は、アーキア、バクテリア、真核生物に由来する様々な全トランス型プレニル二リン酸合成酵素に対して、ドナー基質として DMAPP の代わりに HMBPP を与え、IPP と反応させることでプレニル基転移反応が起こるか否かを確認した。その結果、複数の酵素で転移反応が観察され、それぞれ鎖長の異なる生成物が得られた。これらの、HMBPP と反応した全トランス型プレニル二リン酸合成酵素のカイネティクス解析を行った結果、HMBPP に対する *Km* 値は、DMAPP に対する *Km* 値と比べて１～２桁ほど大きかったものの、*kcat* 値には大きな差はみられなかった。HMBPP をドナー基質に用いるプレニル基転移酵素としては、植物においてサイトカイニンの生合成に関わるトランス-ゼアチン合成酵素が知られているが、本研究によって、同酵素とは異なるタイプのプレニル基転移酵素も HMBPP をドナー基質として利用し得ることが示された。以上のことから、HMBPP がプレニル基転移酵素のドナー基質となる現象は、例外的なものではないことが示唆された。

prenyltransferase, isoprenoid, MEP pathway

講演番号：3C11a10
講演日時：3 月 19 日 11:45～ C 校舎 11 会場

*Flavobacterium johnsoniae* 由来メバロン酸経路関連酵素の同定と機能解析
Identification and functional analysis of the enzymes related with the mevalonate pathway from *Flavobacterium johnsoniae*

○早川 祝、祖父江 史明、吉村 徹、邊見 久（名大院生命農）
○Hajime HAYAKAWA, Fumiaki SOBUE, Tohru YOSHIMURA, Hisashi HEMMI (Nagoya Univ.)

最大の天然有機化合物群であるイソプレノイドは、炭素数 5 の活性イソプレン単位であるイソペンテニル二リン酸（IPP）と、その構造異性体であるジメチルアリル二リン酸を前駆体として合成される。メバロン酸（MVA）経路は、アセチル CoA を出発物質とし、MVA を経てそれらの前駆体を合成する経路である。真核生物と一部のバクテリア、アーキアに存在する古典的 MVA 経路においては、MVA から IPP への変換は、メバロン酸キナーゼ（MVK）、ホスホメバロン酸キナーゼ（PMK）、ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ（DMD）により順に触媒される。

Bacteroidetes 門に属する一部のバクテリアのゲノムには、DMD を初めとする古典的 MVA 経路関連酵素の大半のホモログ遺伝子が存在するが、MVK と PMK については、既知酵素に高い相同性を示すタンパク質の遺伝子が見当たらない。そこで我々は、放射標識した MVA 経路の代謝中間体を、Bacteroidetes 門に属する *Flavobacterium johnsoniae* の無細胞抽出液と反応させた。その結果、一部の中間体の IPP への変換が確認できた。これは古典的 MVA 経路の存在を示唆する結果であったので、同菌から MVK と PMK の候補遺伝子を探索したところ、既知の MVK や PMK と同じく GHMP キナーゼファミリーに属するタンパク質をコードした機能未知遺伝子 *Fjoh_1387* と *Fjoh_1417* を発見した。それらがコードするタンパク質のアミノ酸配列を既知の MVK および PMK のものと比較すると、いずれの場合も相同性は 20%未満と低かった。MVK もしくは PMK の候補遺伝子 *Fjoh_1387* および *Fjoh_1417* と、DMD のホモログ遺伝子である *Fjoh_1389* を pET15b ベクターに挿入して大腸菌に導入し、得られた形質転換体を用いてそれぞれがコードするタンパク質を大量発現させた。これらを Ni-アフィニティカラムにより精製し、基質特異性評価を行った。その結果、*Fjoh_1387*、*Fjoh_1417*、*Fjoh_1389* がコードするタンパク質は、それぞれ MVK、PMK、DMD 活性を示した。各酵素の速度論解析を行ったところ、得られたカイネティックパラメータは他生物由来の酵素のものに近い値を示した。以上より、*F. johnsoniae* が古典的 MVA 経路を有することが証明された。系統解析の結果、*F. johnsoniae* 由来の MVK と PMK は既知酵素から進化的に遠いことが示された。また、同菌由来の DMD も、機能が同定された酵素の中では最も、ホスホメバロン酸デカルボキシラーゼやメバロン酸 3-キナーゼといった最近見出された変形メバロン酸経路中の酵素に近縁であった。それゆえ、同菌の古典的 MVA 経路がどのように進化してきたのかは非常に興味深い。

Mevalonate pathway, Isoprenoid, Enzyme

発表責任者：早川祝（syuku0320@gmail.com）

講演番号：3C11p01
講演日時：3 月 19 日 14:00～ C 校舎 11 会場

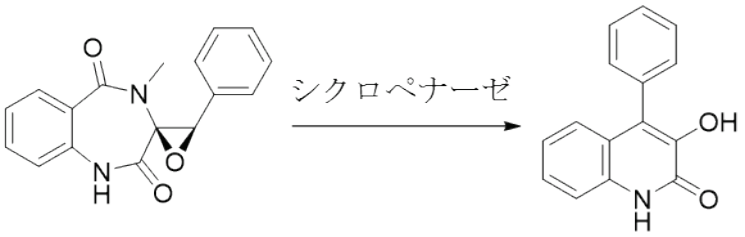
メチルイソシアネートの脱離を伴う特異な変換反応を触媒する糸状菌由来酵素シクロペナーゼの発見と機能解析

Discovery and function of cyclopenase, an enzyme catalyzing atypical reaction of cyclopenins to form viridicatins in fungal biogenesis

○岸本 真治、石川 格靖、原 幸大、山田 陽香、平山 裕一郎、橋本 博、恒松 雄太、渡辺 賢二（静岡県大薬）

○ Shinji KISHIMOTO, Noriyasu ISHIKAWA, Kodai HARA, Haruka YAMADA, Yuichiro HIRAYAMA, Hiroshi HASHIMOTO, Yuta TSUNEMATSU, Kenji WATANABE (Univ. Shizuoka)

【背景・目的】微生物が産生する天然物はポリケチド合成酵素、非リボソームペプチド合成酵素、テルペン合成酵素等で合成された母骨格に様々な酵素による修飾が加わることで生合成される。それら修飾酵素の中でも基質化合物の骨格を変換する酵素は天然物の多様性創出に大きく関わっている。このような基質化合物の骨格を変換する酵素の一つにシクロペナーゼがある。シクロペナーゼは cyclopenin から viridicatin への変換を担う酵素として Luckner らによってその存在が提唱された酵素である [1]。しかし、シクロペナーゼは存在が提唱されたのみであり、どのような配列のタンパク質であるか長らく不明であった。そこで我々はシクロペナーゼの正体とその触媒する反応機構を明らかにするために、viridicatin を生合成中間体とすると予想された penigequinolone 類、aspoquinolone 類の生合成研究を開始した。




【方法・結果・考察】まず、*Penicillium* 属糸状菌 FKI-2140 株をオートミール寒天培地上で培養し、penigequinolone 類を生産している状態で菌糸を回収した。この菌糸を破砕して菌体抽出液を得たのちに酵素活性を指標に分画することで粗精製シクロペナーゼを得た。次に、シクロペナーゼ遺伝子の獲得を試みた。FKI-2140 株のドラフトゲノムを解読後、penigequinolone 類の生合成に必要と推定される遺伝子を全て含む遺伝子クラスターを探索し、*png* クラスターを見出した。一方、aspoquinolone 類生産菌である *Aspergillus nidulans* のゲノム中にも *png* クラスターと構成要素のよく似た *asq* クラスターを見出した [2]。粗精製シクロペナーゼから得られた情報を元に *png*、*asq* 両クラスター中での候補遺伝子を絞り込み、それらを大腸菌で異種宿主発現させた。その菌体破砕液のシクロペナーゼ活性を測定したところ、二次代謝への関与が予想されなかったヘモシアニン様タンパク質 PngL、AsqI がシクロペナーゼ活性を有していることが明らかとなった。これら二つの組換え体酵素のうち可溶性画分中に得られた AsqI を精製し生化学的解析を行った結果、その酵素活性には金属イオンが関与していることが示唆された。また、AsqI が cyclopenin を viridicatin へと変換する際に、反応性が高く有毒なメチルイソシアネートが生成することも明らかとなった。さらに詳細な触媒メカニズムを解明するため AsqI のタンパク質結晶を取得し、現在、構造解析を進めている。

【文献】

1. Luckner, M. *Eur. J. Biochem.* **1967**, *2*, 74.
2. Ishikawa, N. *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 12880.

cyclopenase, hemocyanin like protein, methyl isocyanate

発表責任者：渡辺　賢二（kenji55@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：3C11p02
講演日時：3 月 19 日 14:15～ C 校舎 11 会場

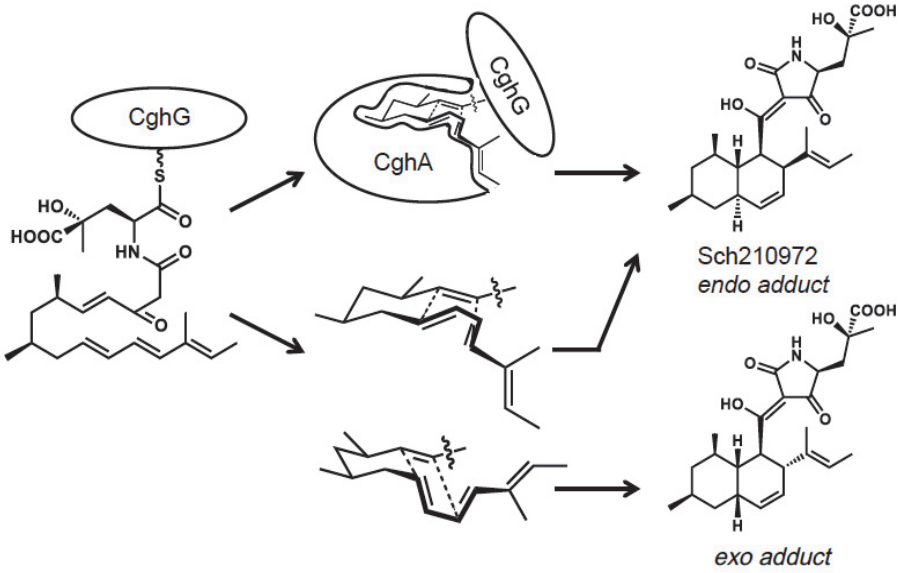
# 立体選択的な環化反応を触媒する酵素 CghA の反応機構解析

# Mechanistic insights into the stereoselective cycloaddition catalyzed by an enzyme, CghA

○横山 葵、岸本 真治、佐藤 道大、原 幸大、恒松 雄太、橋本 博、渡辺 賢二（静岡県大薬）
○Mamoru Yokoyama, Shinji Kishimoto, Michio Sato, Kodai Hara, Yuta Tsunematsu, Hiroshi Hashimoto, Kenji Watanabe (Univ. Shizuoka)

**[背景・目的]** 糸状菌 *Chaetomium globosum* によって生産される Sch210972 は、その分子内にオクタリン(octahydronaphthalene)骨格を有することから、生合成に Diels-Alder 反応が関与すると推測されていた。我々はこれまでに、*C. globosum* における遺伝子破壊実験、*Aspergillus nidulans* 異種宿主発現系による生合成系の再構築により、Diels-Alder 反応を触媒する酵素遺伝子として *cghA* を同定した [1]。Diels-Alder 反応を触媒するのではないかと推測されている複数の機能未知遺伝子に対し、*cghA* は比較的相同性が高い。実際に、*cghA* 存在下における生合成産物は単一の立体異性体であるのに対し、非存在下では非天然型のジアステレオマーが生産されたことから、CghA は立体選択的な Diels-Alder 反応を触媒する酵素と予想された。そこで、本研究においては CghA の触媒機構を実験的に解明することを目指した。

**[方法・結果]** タンパク質の X 線結晶構造解析により、CghA の触媒する反応の機構を解析できると考えた。はじめに、*C. globosum* より調製した cDNA をもとに 5'-および 3'-RACE 法により *cghA* の全遺伝子配列を決定した。種々検討の結果、コドンを最適化させた *cghA* 合成遺伝子の利用により、大腸菌を宿主とした目的タンパク質の大量生産に成功した。続いて、クロマトグラフィーによる精製、結晶化条件のスクリーニングを経て、CghA タンパク質結晶の獲得に成功した。




1. Sato, M. *et al. ChemBioChem* **2015**, *16*, 2294-2298.

biosynthesis, Diels-Alder reaction

発表責任者：渡辺賢二（kenji55@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：3C11p03
講演日時：3 月 19 日 14:30～ C 校舎 11 会場

# イネにおけるフェアリー化合物の新プリン代謝経路上での生合成に関する研究
# Studies on biosynthesis of fairy chemicals on a novel purine metabolic pathway in rice

○崔 宰熏[1,2]、伏見 圭司[3]、成川 礼[2,3]、平井 浩文[1,2]、浅川 倫宏[4]、稲井 誠[5]、菅 敏幸[5]、河岸 洋和[1,2,6]（[1]静大院農・応生化、[2]静大・グリーン研、[3]静大・理、[4]東海大・創造、[5]静県大・薬、[6]静大院・創造）

○Jae-Hoon Choi[1,2], Keiji Fushimi[3], Rei Narikawa[2,3], Hirofumi Hirai[1,2], Tomohiro Asakawa[4], Makoto Inai[5], Toshiyuki Kan[5], Hirokazu Kawagishi[1,2,6] ([1]Department of Applied Biochemistry, Graduate School of Agriculture, Shizuoka Univ., [2]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, [3]Department of Biological Science, Faculty of Science, Shizuoka University, [4]Institute of Innovative Science and Technology, Tokai University, [5]School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, [6]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University)

【目的】我々はフェアリーリングを惹起する物質（フェアリー化合物，fairy chemicalsと総称）としてコムラサキシメジの培養濾液から植物成長調節活性を有する2-azahypoxanthine (AHX) を単離し、AHXが植物内で内生されていることも報告した[1,2]。また、AHXは化学合成法が既に知られており、5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICA) を前駆体として合成されることから[3,4]、AHXの生合成もAICAが前駆体と考え、その経路が存在していることを証明した[2]。さらに我々は、図1のようにAICAリボチド(AICAR)からAHXリボチド(AHXR)とAOHリボチド(AOHR)が、それらのリボチドからAHXとAOHに代謝される可能性も考えた。本研究ではAHXRからAHXへの合成酵素の同定を目的とした。

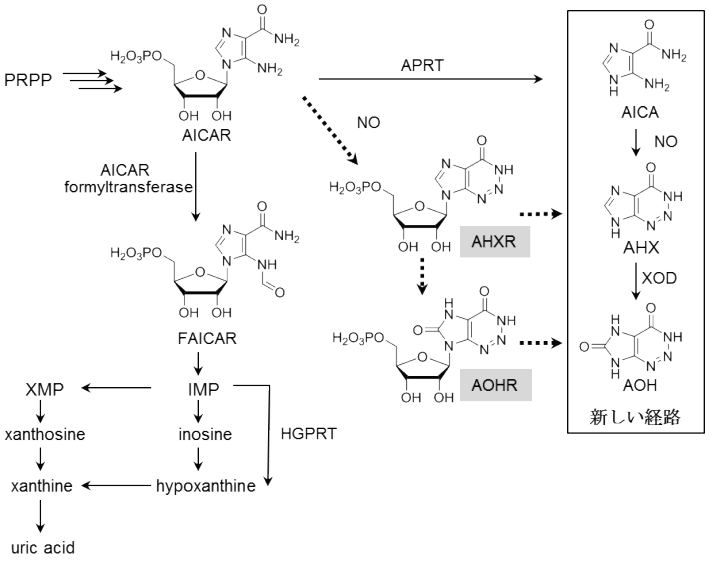



図 1 既知プリン代謝経路と新規フェアリー化合物生合成・代謝経路
（灰色は推定生合成前駆体、破線は推定経路、枠内はこれまでに同定した新経路）

【方法・結果】APRTに類似した反応を触媒する酵素として、hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT)が知られており、ホススホリボースの付加・脱離反応によってhypoxanthine（HX）とIMPおよびguanineとGMPの可逆的な相互変換反応を触媒している。イネのゲノム情報からは1種類のみ存在することを確認した。このイネ由来のHGPRTにHisタグを融合したコンストラクトを作製し、得られたプラスミドDNAをタンパク質発現用大腸菌（BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL）に形質転換を行った。大量培養後、回収した菌体から粗酵素液を得た後、His タグ精製を行った。HXとIMPの可逆的な変換活性を持つタンパク質が得られた。現在、詳細に研究を進めている。

1) J.-H. Choi et al., *ChemBioChem*, 11, 1373-1377 (2010)、2) J.-H. Choi et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 53, 1552-1555 (2014)、3) Y. Wang et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 6, 185-188 (1996)、4) K. Ikeuchi et al. *Org. Biomol. Chem.*, 12, 3813-3815 (2014)

fairy ring, fairy chemicals, biosynthesis

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3C11p04
講演日時：3 月 19 日 14:45～ C 校舎 11 会場

フェアリー化合物 ICA の代謝に関する化学的研究
Chemical studies on metabolism of fairy chemical ICA

○松崎 信生[1]、崔 宰熏[2,3]、平井 浩文[2,3]、近藤 満[3]、稲井 誠[4]、浅川 倫宏[5]、菅 敏幸[4]、河岸 洋和[1,2,3] ([1]静大院・創造、[2]静大院農・応生化、[3]静大・グリーン研、[4]静県大・薬、[5]東海大・創造)
○Nobuo MATSUZAKI[1], Jae-Hoon CHOI[2,3], Hirai HIROFUMI[2,3], Mitsuru KONDO[3], Makoto INAI[4], Tomohiro ASAKAWA[5], Toshiyuki KAN[4], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3] ([1]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, [2]College of Agriculture, Academic Institute, Shizuoka University, [3]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, [4]School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, [5]Tokai University Institute of Innovative Science and Technology)

【目的】フェアリーリングを引き起こす化合物として、これまでにコムラサキシメジ（*Lepista sordida*）から、2-azahypoxanthine (AHX) と imidazole-4-carboxamide (ICA) が単離されている[1,2]。AHX は植物に内生する物質であり、また植物内で 2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH) に代謝されて、植物の成長を促進することも明らかにされている[3]。またイネおよびコムラサキシメジの体内で 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICA) から AHX へ代謝されることが証明されており、AHX のプリン代謝への関与が示されている[3,4]。ICA は主に植物の成長抑制に関わることが示されており、イネの体内では、ICA リボシドを含む 3 つの代謝産物に可逆的に変換されることが判明している[5]。イネ以外の植物でも同様の代謝が見受けられ、さらに ICA と ICA リボシドは様々な植物に普遍的に内生することが示された[6]。本研究では、未知の ICA 代謝産物の探索、また AICA もしくは AICA リボチドからの ICA への代謝を通したプリン代謝経路への関与の証明に向けた実験を行った。

【方法・結果】
○ICA の代謝産物の探索:イネの種子を 3 日間培養して発芽させた後に、100 μM ICA の培地で 1 週間培養した。培養後、地上部と根に分けて EtOH 抽出を行い、抽出物を LC-MS/MS で分析したところ、ICA リボチドであると認められるピークが検出され、イネ体内での ICA の ICA リボチドへの変換が示された。
○プリン代謝経路と ICA の関与の確認:イネの種子を 3 日間培養して発芽させ、培養液に苗を移してさらに 2 日培養した後に、ICA の前駆体であると予想される AICA、AICA リボチドを添加した培地で 2 日間培養を行った。培養後、EtOH でイネを地上部と根に分けて抽出し、抽出液を濃縮した後に、各種分析を行ったところ、ICA のプリン代謝への関与を示す結果が示された。

1) Choi *et al*, *ChemBioChem,* 11. 1373-1377 (2010)
2) Choi *et al*, *J. Agric. Food Chem.*, 58. 9956-9959 (2010)
3) Choi *et al*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 53. 1552-1555 (2014)
4) Suzuki *et. al*, *Sci. Rep.*, in press
5) 松崎ら，日本農芸化学会講演要旨集（2015）
6) 松崎ら，日本農芸化学会講演要旨集（2016）

fairy ring, imidazole-4-carboxamide, purine metabolic pathway

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3C11p05
講演日時：3 月 19 日 15:00～ C 校舎 11 会場

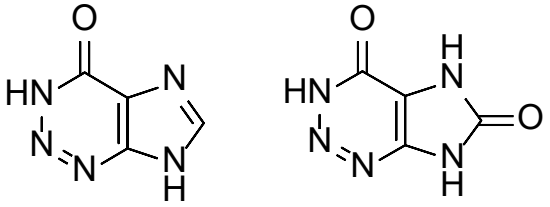
フェアリー化合物 AHX と AOH に対する糖転移酵素に関する研究
Studies on glucosyltransferase(s) to form glucosides of fairy chemicals AHX and AOH

○近藤 遼一[1]、澤田 梓[1]、崔 宰熏[1,2]、平井 浩文[1,2]、浅川 倫宏[3]、稲井 誠[4]、菅 敏幸[4]、河岸 洋和[1,2,5] ([1]静岡大院・総合農、[2]静岡大・グリーン研、[3]東海大・創造、[4]静岡県大・薬、[5]静岡大院・創造)

○ Ryoichi KONDOH[1], Azusa SAWADA[1], Jae-Hoon CHOI[1,2], Hirofumi HIRAI[1,2], Tomohiro ASAKAWA[3], Makoto INAI[4], Toshiyuki KAN[4], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,5] ([1]Graduate School of Integrated Science and Technology , Shizuoka University, [2]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, [3]Institute of Innovative Science and Technology, Tokai University, [4]School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, [5]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University)

【目的】

我々はフェアリーリング惹起物質としてコムラサキシメジ培養濾液から植物成長調節活性を有する 2-azahypoxanthine (AHX)を単離し、AHX が植物内で内生されていることを報告した[1,2]。また、AHX をイネ科等の植物に投与すると 2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH)に代謝され、この AOH もまた植物成長調節活性を有することが確認されている[2]。さらに、2013 年度本大会において植物内から AHX 及び AOH の代謝産物が検出され、これらはβ-D-グルコシドであると報告した[3]。これらの化合物の生成には glucosyltransferase の関与の可能性が示唆された。本研究では、この酵素を同定することを目的とした。




【方法・結果】

LC-MS/MS における AHX-グルコシド, AOH-グルコシドの最適な検出条件を検討した。また、イネの培養細胞を 25 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 8.0)で抽出を行い、40%と 70%の濃度で順次硫安沈殿を行った。70%硫安沈殿画分を弱陰イオン交換クロマトグラフィー(Macro-Prep DEAE)で分画後、各画分に AOH を添加し酵素活性試験を行った。これらを LC-MS/MS で分析したところ、一部の画分で AOH-グルコシドの生成が確認できた。この酵素活性を指標に活性画分を強陰イオン交換クロマトグラフィー(Macro-Prep High Q)、ゲル濾過クロマトグラフィー(Enrich SEC 70)で分画した。活性画分を SDS-PAGE に供し、得られたバンドをトリプシン消化後 Mascot 解析により同定を試みている。

1) J.-H. Choi et al., *ChemBioChem*, 11, 1373-1377 (2010)
2) J.-H. Choi et al., *Angew. Chem. Int. Ed.,* 53, 1553-1555 (2014)
3) 竹田 翔伍ら、2013 年日本農芸化学会大会講演要旨集

fairy ring, glucosyltransferase, biosynthesis

発表責任者：近藤遼一（konkon.568@gmail.com）

講演番号：3C11p06
講演日時：3 月 19 日 15:25～ C 校舎 11 会場

コムラサキシメジ（*Lepista sordida*）におけるフェアリー化合物の生合成経路に関する研究
Studies on biosynthetic pathway of fairy chemicals in *Lepista sordida*

○伊藤 彰将[1]、寺島 百合香[1]、崔 宰熏[1,2]、恒松 雄太[3]、渡辺 賢二[3]、鈴木 智大[4]、平井 浩文[1,2]、浅川 倫宏[5]、稲井 誠[3]、菅 敏幸[3]、河岸 洋和[1,2,6]（[1]静岡大院・総合農、[2]静岡大・グリーン研、[3]静岡県大・薬、[4]宇都宮大・バイオ、[5]東海大・創造、[6]静岡大院・創造）
○ Akinobu ITO[1], Yurika TERASHIMA[1], Jae-Hoon CHOI[1,2], Yuta TSUNEMATSU[3], Kenji WATANABE[3], Tomohiro SUZUKI[4], Hirohumi HIRAI[1,2], Tomohiro ASAKAWA[5], Makoto INAI[3], Toshiyuki KAN[3], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,6] ([1]Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University, [2]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, [3]Department of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, [4]Center for Bioscience Research and Education, Utsunomiya University, [5]Institute of Innovative Science and Technology, Tokai University, [6]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University)

【目的】
フェアリーリング惹起物質としてコムラサキシメジ (*Lepista sordida*) 菌糸体培養濾液から単離された 2-azahypoxanthine (AHX) 及び imidazole-4-carboxamide (ICA) は、分類学上の科に無関係に試した全ての植物に対して成長調節活性を示し[1,2]、更に AHX を処理することによってイネやコムギ等の収量が大幅に増加した[3,4]。また、AHX が様々な植物に内生し[5]、最近多くのキノコに内生していることも判明したが、フェアリー化合物の生合成経路は未だ不明な点が多い。前回の大会で、*L. sordida* における AHX 及び ICA の生合成に L-Arg が関与していること、nitric oxide synthase (NOS) によって L-Arg から生成する NO が関与していることを報告した[6]。本大会でも引き続き *L. sordida* における AHX 及び ICA の生合成経路の解明を目的とし、これらの生合成に関与する遺伝子群の探索を行った。
【方法・結果】
*Streptomyces cremeus*のゲノム中にはcremeomycinの生合成遺伝子クラスターが存在しており、これらの遺伝子群のうち*creD*、*creE*によってL-Aspから亜硝酸 ($HNO_2$) が生成することが報告された[7]。*creD*、*creE*の配列を用いて*L. sordida*のゲノムデータベース上でBLAST検索した結果、それぞれ34.7%、29.1%のidentityを示す遺伝子の存在が確認された。また、AHX及びICAの予想前駆体である5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranosyl 5'-monophosphate (AICAR) を培地に添加して*L. sordida*を培養することで、nitrite reductase遺伝子(*nir*) の発現が増加した[8]。これらの結果から、*L. sordida*のゲノム中の*creDE*様遺伝子や*nir*がAHX及びICAの生合成に関与していると考えた。大腸菌を宿主とし、*S. cremeus*の*creD*、*creE*の塩基配列をもとに大腸菌発現系にコドンを最適化した遺伝子を発現させることで、CreD、CreEを調製した。これらの酵素を用いて、L-AspとAHX及びICAの化学合成前駆体である5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICA) を基質として*in vitro*での活性試験を行った。現在、*L.sordida*の*creDE*様遺伝子のクローニングを行い、詳細に研究を進めている。

1) Choi, J-H. *et al*. *ChemBioChem*. 11, 1373-1377 (**2010**), 2) Choi, J-H. *et al*. *J. Agric. Food Chem.* 58, 9956-9959 (**2010**), 3) Asai, T. *et al*. *Jpn. Agric. Res. Quart*. 49, 45-49 (**2015**), 4) Tobina, H. *et al*. *Field Crop Res*. 162, 6-11 (**2014**), 5) Choi, J-H. *et al*. *Angew. Chem. Int. Ed*. 53, 1552-1555 (**2014**), 6) 伊藤ら、2016 年日本農芸化学会大会講演要旨集, 7) Sugai, Y. *et al*. *Nat. Chem. Biol.* 12, 73-77 (**2016**), 8) 寺島ら、2016 年日本農芸化学会大会講演要旨集

fairy rings, *Lepista sordida*, plant growth regulator

発表責任者：河岸 洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

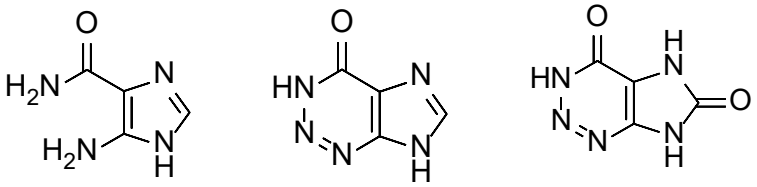
講演番号：3C11p07
講演日時：3 月 19 日 15:40～ C 校舎 11 会場

*Burkholderia contaminans* CH-1 株におけるフェアリー化合物 AOH の生成酵素について
Studies on AOH-forming enzyme in *Burkholderia contaminans* CH-1

○杉浦 輝[1]、崔 宰熏[1,2]、徳山 真治[1]、平井 浩文[1,2]、稲井 誠[3]、浅川 倫宏[4]、菅 敏幸[3]、河岸 洋和[1,2,5] ([1]静大院農・応生化、[2]静大・グリーン研、[3]静県大・薬、[4]東海大・創造、[5]静岡大院・創造)
○Hikaru SUGIURA[1], Jae-Hoon CHOI[1,2], Shinji TOKUYAMA[1], Hirofumi HIRAI[1,2], Makoto INAI[3], Tomohiro ASAKAWA[4], Toshiyuki KAN[3], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,5] ([1]Department of Applied Biochemistry, Graduate School of Agriculture, Shizuoka University, [2]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, [3]School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, [4]Institute of Innovative Science and Technology, Tokai University, [5]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University)

【目的】

我々はフェアリーリング惹起物質としてコムラサキシメジの培養濾液から植物成長調節活性を有する 2-azahypoxanthine (AHX) を単離し、AHX が植物内で内生されていることを明らかにした[1,2]。また、AHX は化学合成法が既に知られており、5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICA)を前駆体として合成される。さらに、AHX をイネ科等の植物に投与すると、2-aza-8-oxohypoxanthine（AOH）に代謝され、この AOH もまた植物成長調節作用を有することが確認されている[2)]。AOH は化学合成が難しいが、以前に AHX から AOH を効率的に変換する菌を発見し、それを *Burkholderia contaminans* と同定し CH-1 株と命名した。この CH-1 株の静止細胞を用いることにより、10.6 mmol AOH を単離収率 91%で生物変換することができた[3)]。そこで本研究では、CH-1 株における AOH 合成酵素の同定を目的とした。



AICA　　AHX　　AOH

【方法・結果】

TSB 培地(polypeptone 17 g, soy peptone 3g, NaCl 5 g, $K_2HPO_4$ 2.5 g, and glucose 2.5 g /L. pH 7.3)に CH-1 株を植菌し、30℃、180 rpm で前培養 60 時間、本培養 60 時間振とう培養した。得られた菌体を凍結破砕し、25 mM Phosphate buffer (pH 6.0), 0.5 mM EDTA, 0.2% CHAPS, 10% glycerol を 50 ml 加え、4℃で 3 時間静置した。この抽出液および菌体培養ろ液に AHX を加え、30℃で 12 時間反応させることで AOH 合成活性を確認した。抽出液に AOH 合成活性を確認したため、硫安沈殿、遠心限外濾過による分子量分画に供したところ、70%硫安沈殿の 100 kDa 以上の画分に AOH 合成活性が確認された。この画分の陰イオン交換および各種クロマトグラフィーによる酵素の精製を試みている。

1) J.-H. Choi et al., *ChemBioChem*, 11, 1373-1377 (2010)
2) J.-H. Choi et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 53, 1553-1555 (2014)
3) J.-H. Choi et al., *Biosci Biotechnol Biochem.*, 80, 2045-50 (2016)

2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH), AOH-forming enzyme, *Burkholderia contaminans*

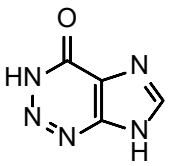
発表責任者：河岸　洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

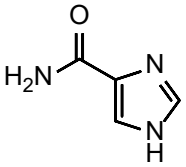
講演番号：3C11p08
講演日時：3 月 19 日 15:55～ C 校舎 11 会場

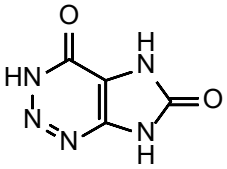
高感度検出方法を用いたイネにおけるフェアリー化合物の定量化
Quantification of fairy chemicals in rice by a high-sensitive detection method
○竹村 太秀[1]、澤田 梓[2]、伊藤 彰将[2]、崔 宰熏[1,2,3]、平井 浩文[1,2,3]、稲井 誠[4]、菅 敏幸[4]、浅川 倫宏[5]、河岸 洋和[1,2,3,6]（[1]静大農・応生化、[2]静大院・総合農、[3]静大・グリーン研、[4]静岡県大・薬、[5]東海大・創造、[6]静岡大院・創造）
○Hirohide Takemura[1], Azusa Sawada[2], Akinobu Itou[2], Jaehoon Choi[1,2,3], Hirofumi Hirai[1,2,3], Makoto Inai[4], Toshiyuki Kan[4], Tomohiro Asakawa[5], Hirokazu Kawagishi[1,2,3,6] ([1]Fac. of Agric., Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. of Int. Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [3]RIGST, Shizuoka Univ., [4]Sch. of Phar. Sci., Univ. of Shizuoka, [5]Inst. of Innov. Sci. and Tech., Tokai Univ., [6]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ.)

【目的】以前、本研究室ではフェアリーリング惹起物質として 2-azahypoxanthine（AHX）、imidazole-4-carboxamide（ICA）及び 2-aza-8-oxohypoxanthine（AOH）を単離し、これらの化合物をフェアリー化合物（fairy chemicals, FCs）と称している[1-3]。AHX 及び AOH は植物に普遍的に内生しており、植物成長調節活性を有していることから、FCs の生合成経路について様々な研究が行われている[1-3]。しかし、FCs を高感度に検出するための前処理として HPLC による部分精製を行う必要があり、多大な時間と労力を有する必要があった。

本研究では、固相抽出を用いた新たな精製方法を確立することで[4]、従来までは検出されていない FCs 及びその代謝産物（フェアリー関連化合物）の検出を可能にすることを目的とした。また、確立した検出方法を用いてイネに内生するこれらの化合物の定量化を目的とした。


AHX


ICA


AOH

【方法・結果】試料を MeOH/$H_2O$/HCOOH＝15/1/4 の溶媒で抽出し、逆相カラム（Oasis HLB）を用いて第一段階の部分精製を行った。この溶出液を濃縮し、2% HCOOH で再溶解させ、強イオン交換－逆相ミックスモード充填剤（Oasis MCX）を用いて 2% HCOOH、MeOH、5% $NH_4OH$、5% $NH_4OH$（60% MeOH）で順次溶出し、第二段階の精製を行った。得られた各溶出液を LC-MS/MS に供した結果、従来までは検出されていなかった FCs 及びその代謝産物の内生が確認された。

現在は様々な条件（ストレスなど）で培養したイネと、内部標準物質として FCs の安定同位体ラベル化体を混合後、上記の方法を用いて精製し、LC-MS/MS に供することでイネにおける FCs 及びその代謝産物の定量化を進めている。

1) J-H. Choi *et al. ChemBioChem*. 11. 1373-1377 (2010),
2) J-H. Choi *et al. J. Agric. Food Chem.* 58. 9956-9959 (2010)
3) J-H. Choi *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* 53. 1553-1555 (2014)
4) M. Kojima *et al. Plant Cell Physiol.* 50. 1201-1214 (2009)

fairy ring, plant growth regulator, *oryza sativa*

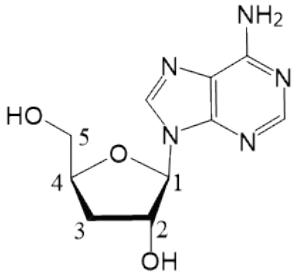
発表責任者：河岸　洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3C11p09
講演日時：3 月 19 日 16:10～ C 校舎 11 会場

冬虫夏草 *Cordyceps militaris* における cordycepin 生合成経路の研究
Studies on biosynthetic pathway of cordycepin in *Cordyceps militaris*

○天内 優子[1]、崔 宰熏[1,2]、恒松 雄太[3]、渡辺 賢二[3]、道羅 英夫[2]、鈴木 智大[4]、河岸 洋和[1,2,5] ([1]静大農・応生化、[2]静大・グリーン研、[3]静県大・薬、[4]宇都宮大・バイオ、[5]静大院・創造)
○ Yuko AMANAI[1], Jae-Hoon Choi[1,2], Yuta Tsunematsu[3], Kenji Watanabe[3], Hideo Dohra[2], Tomohiro Suzuki[4], Hirokazu Kawagishi[1,2,5] ([1]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [2]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, [3]Department of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, [4]University Center for Bioscience Research and Education, Utsunomiya University, [5]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University)

**【目的】冬虫夏草は昆虫などから生じるキノコの総称であり、約 400 種が確認されている。その１種サナギタケ *Cordyceps militaris* は栄養補助食品や生薬として広く利用されており、東アジアにおいては癌患者の治療薬として古くから用いられてきた。特に *C. militaris* によって生産される cordycepin は強力な抗腫瘍活性を示すために薬理活性における研究が盛んに進められている [1,2]。Cordycepin は adenosine から 3 位の水酸基が欠落した構造を持っており、本分子が合成途中の DNA 鎖に組み込まれ、複製阻害により細胞毒性が起こり生物活性が発現されると考えられている。このように本化合物の構造は比較的単純であるにも関わらず、その生合成については、これまでに ATP 等の前駆体取り込み実験等が行われているのみであり、遺伝子・酵素レベルでは明らかにされてはいなかった。そこで、本研究においては *C. militaris* における cordycepin 生合成経路を特定し、生合成酵素の機能の詳細を明らかにすることを目的とした。**



Cordycepin

【方法・結果】 *C. militaris* から単離された cordycepin 類縁体の構造から、cordycepin 生合成酵素は puromycin 生合成酵素との類似性が高いと予測した [3,4]。そこで、*Streptomyces alboniger* 由来 puromycin 生合成遺伝子クラスター中の複数の酵素遺伝子に類似する配列を *C. militaris* ゲノム配列情報から検索した。その結果、*C. militaris* は puromycin 生合成クラスターと相同性の高い遺伝子群 *cgp* クラスターを保有していることを見出した。そのうち *cgp1620* は 1 つの ORF に oxido-reductase と amino-transferase の 2 つの異なる機能性を持ったドメインを有するとアノテーションされていたため、5'-および 3'-RACE 法によって ORF に終止コドンが含まれていないか正しい遺伝子配列を決定した。*cgp1620~1625* の各遺伝子は ATP の五炭糖 3 位の水酸基を酸化・アミノ基転移を行う酵素遺伝子と高い相同性を示した。現在、大腸菌や *Aspergillus* 属糸状菌を用いた異種発現系、*C. militaris* 形質転換系の樹立により、cordycepin の生合成経路の解析を行っており、その結果を報告する。

(1) Cunningham, K. G. *et al.*, *Nature*, 166, 949 (1950). (2) Yu, R. *et al.*, *Fitoterapia*, 75, 465-472 (2004). (3) Guarino, J. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 12, 3300-3302 (1961). (4) Jimenez, A. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271, 1579-1590 (1996).

*Cordyceps militaris*, cordycepin, biosynthesis

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3C11p10
講演日時：3 月 19 日 16:25～ C 校舎 11 会場

β―アミリン合成酵素:W534, L734 及び Y736 残基の機能解析～CH-π相互作用の可能性について～
β-Amyrin synthase from *Euphorbia tirucalli*. Functional Analyses of W534, L734 and Y736 residues: Implication for CH-πInteraction
○相場 悠圭里、渡辺 拓海、星野 力、寺沢 有里、仲野 千秋（新潟大院自）
○Yukari AIBA, Takumi WATANABE, Tsutomu HOSHINO, Yuri TERASAWA, Chiaki NAKANO (Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ.)

[目的]我々は、β―アミリン合成酵素の触媒機構解明を目的として、活性部位の特定とその機能解析を進めてきた。[1-4] また、化学合成した基質アナログの酵素反応を検討し、[5-8]基質 2,3-オキシドスクアレンの 23*Z*-Me (Me-30)が酵素に強く捕捉されることを見出した。[6,7] 23*Z*-Me の捕捉残基として W257 の可能性が高く、CH-π相互作用を提案した。[4] 今回、W534, L734 及び Y736 残基について検討した。[方法と結果](1)W534 残基について:脂肪族アミノ酸置換体(A, V, I, M)全てで活性がほとんど消失した。一方芳香族アミノ酸 F や Y 置換体も脂肪族置換体と比較してもそれほど大きく相対活性が向上しなかった(Wild の~10%)。W612 残基は F や Y 変異株は脂肪族変異株よりも大きく活性が向上している(Wild の 50－60%)。これらの事実は、W534 残基は、カチオンーπ相互作用やバルクサイズの重要性を示しているのではなく、他の機能の存在を示唆する。ホモロジーモデリングから V483 残基との CH-π 錯体が想定された。（２）L734 残基について：G, A, V, I, M とサイズが大きくなるに従って、β―アミリン生産量が上昇した。A 変異株は、β―アミリン以外に未同定物質を生産しており、現在単離同定を進めている。L734 残基の機能として適切なサイズの付与により、基質の正常な folding が行われ、正常なβ―アミリンの生産が行われたものと考えられる。しかし、下記に示したように Y736 残基との CH-π錯体もホモロジーモデリングから想定される。（３）Y736 残基について：A, S, T, L, M 全ての変異株で酵素活性が消失した。しかし、F 変異株のみに高い活性を示した。即ち 736 部位は OH 基のない F でも代用できることを示唆している。これらのデータは、反応中間体で生じるカチオンの安定化（カチオンーπ相互作用）を示唆しているが、モデリングでは、ベンゼン環は水平方向には配置されてない。L734 残基とベンゼン環が近い距離に配置されており、CH-π錯体の可能性が示唆される。V483 残基の A や G 変異体は、カメリオールの単環性トリテルペンを生産する。[9] 変異株の A や G では W534 との CH-π相互用が弱くなったため、基質の配向性が大きく変化し、正常な folding が出来ず単環性で停止したのではないか。また、L734A 変異株も Y736 との CH-π相互作用が弱まったため、両アミノ酸残基のキャビティ中での配向が大きく傾いて、正常な folding が出来ず活性の大きな低下や未同定物質が生成したと想定した。1) Ito et al, *FEBS. J.* **2013**, 280, 1267-80. 2) Ito et al, *Chem.Eur. J,* **2013**, 19, 17150-8. 3) Ito et al., *Org. Biomol. Chem*., **2014**, 12, 3836-46. 4) Ito et al., submitted. 5) Hoshino et al., *Org. Lett*., **2014**, 16, 3548-51. 6） Hoshino et al., *Chem. Eur. J*., **2015**, *21*, 15769-84. 7) Kaneko and Hoshino, *J. Org. Chem.*, **2016**, *811*, 6657-71. 8) Terasawa et al., *Eur. J. Org. Chem.,* in press. 9) 中川ら、農化大会、2015、2E11a06.

β-amyrin, triterpene cyclase, oxidosqualene

講演番号：3C11p11
講演日時：3 月 19 日 16:50～ C 校舎 11 会場

二環性トリテルペン/セスクアテルペン環化酵素の触媒機構の解析
Analysis of catalytic mechanism of bifunctional triterpene/sesquarterpene cyclase
○村上 瑞気、TENKOVSKAIA LIUDMILA、奥野 琴音、上田 大次郎、佐藤 努 (新潟大院自然)
○MIZUKI MURAKAMI, LIUDMILA TENKOVSKAIA, KOTONE OKUNO, DAIJIRO UEDA, TSUTOMU SATO (Niigata University)

我々は *Bacillus* 属細菌におけるテルペン生合成について研究しており、これまでに *Bacillus megaterium* から二機能性セスクアテルペン/トリテルペン環化酵素（TC）を発見している [1)]。TC は tetraprenyl-β-curcumene（**1**; $C_{35}$）を基質とした場合には 4 環骨格を形成するが、squalene（**2**; $C_{30}$）を基質とした場合には 2 環骨格の中間体を形成する [1)]。最近の我々の研究によって、TC が 2 環構造の中間体を基質としてさらに受容し、残っている側鎖から環化して 4 環と 5 環性のオノセロイド（スクアレンの両末端から生合成されるトリテルペン）を生合成することが判明した [2)]。オノセロイド合成酵素の初めての同定であった [2)]。加えて、我々は TC を用いることによって龍涎香の主成分 ambrein の酵素合成に成功した [2)]。本研究において、我々は、基質 **1** と **2** に対して異なる環化モードで触媒するユニークな TC の触媒機構を解析した。特に、オノセロイド生合成において最初の環化が 2 環で止まる要因を追求した。触媒機構の解明はアンブレイン生産を増加させるためにも重要であると考えられる。

TC と 30%の配列相同性を有する Squalene-hopene 環化酵素（SHC）の触媒機構についての研究は非常に進んでいる [3)]。本研究において、我々は SHC 活性部位内でＣ環付近に位置する W169 に相当する、TC の Y167 をターゲットに変異実験を行った。Y167A 変異体と **2** の反応から、未知化合物 **3** の生産が確認され、構造解析によって **3** が非天然型の 3 環性トリテルペノールであることがわかった。Y167L と Y167F が 3 環性化合物を生産していないことから、Y167 残基のバルクサイズが **2** の環化を 2 環で止めるために重要であることが示唆された。**2** の *pre*-C 環のメチル基の位置は **1** と異なっている。我々は、Y167 は **2** のＣ環の環化を妨げるために C-15 のメチル基と相互作用し、**1** の C-14 のメチル基とは相互作用しないことによって、生成物の環状構造の違いが起きていると現在考えている。

本研究はオノセロイド合成酵素の触媒機構について変異酵素を用いて初めて解析したものであり、Y167 の位置でのバルクサイズが２環段階で **2** の環化反応を止めるために重要であることを明らかにした。

[References]
1) Sato, T. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133, 17540-17543.
2) Ueda, D. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, 135, 18335-18338.
3) Hoshino, T. & Sato, T., *Chem. Commun.*, 2002, 291-301.

terpenoid, terpene synthase, onoceroid

発表責任者：佐藤 努（satot@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：3C11p12
講演日時：3 月 19 日 17:05～ C 校舎 11 会場

納豆菌における tetraprenyl-β-curcumene 環化酵素の機能解析
Functional analysis of tetraprenyl-ß-curcumene cyclase in *Bacillus subtilis* natto
○高橋 宏忠、上田 大次郎、佐藤 努 (新大院自然)
○Hirotada TAKAHASHI, Daijiro UEDA, Tsutomu SATO (Niigata Univ.)

我々は、これまでほとんど研究されてこなかった $C_{35}$ の炭素数を有する、セスクアテルペン（我々が提案している分類名）の研究を行ってきている[1,2]。我々は、一連のセスクアテルペンの生合成酵素の同定・酵素機能解析研究の過程で、*Bacillus* 属細菌由来のテルペン環化酵素（TC）を用いると、$C_{35}$ の単環性の基質からは五環性セスクアテルペンが、$C_{30}$ のスクアレンからは二環性トリテルペンが得られることを明らかにした[3]。興味深いことに、TC は二環性トリテルペンのさらなる環化を触媒し、オノセロイド（スクアレンの両末端環化によって生合成されるトリテルペン）を与える。これにより、TC が $C_{35}$ と $C_{30}$ の基質から異なるモードの環化反応を触媒する、二機能性酵素であることを初めて示した[4]。また、納豆菌（*B. subtilis* natto）細胞内において *Bacillus* 属から初めて既知セスクアテルペンの(all-*E*)-ヘプタプレノール 1 を検出した。今回、納豆菌細胞内において、TC はさらに別の基質を環化する機能があることを見出したので報告する。

納豆菌を市販の納豆から単離して、芽胞形成培地にて培養後、脂質成分を GC-MS 分析したところ、枯草菌などの他の *Bacillus* 属細菌（現在まで我々は 17 種類を分析）にはない環化物と予想される未知ピークを 5 つ検出した。

さらに、大腸菌組換え体の枯草菌 TC（納豆菌 TC の遺伝子配列を解読したが、枯草菌と 99%のアミノ酸配列相同性であった）を、化学合成した 1 とインキュベートし、生成物を GC-MS にて解析したところ、納豆菌の未知天然物 2 と一致した。したがって、1（45 mg）を TC 発現した大腸菌無細胞抽出液（24L 培養由来）とインキュベートして生成物 2 を生合成し、各種クロマトグラフィーによって純品 2 を 2.2 mg 単離した。2 の NMR 構造解析を行ったところ、予期せず、ファルネシルファルネシルアセトン 3 の環化物であることがわかった。1 が大腸菌由来の酵素によって 3 に変換され、その後 TC と反応したと考えている。納豆菌を含む *Bacillus* の細胞内ではメナキノン-7（MK-7）の代謝物として 3 が生成することが明らかであり[5]、納豆菌内では MK-7→3→2 のルートで生合成されていると考えられる。また、2 以外の未知ピークは 1 の TC 環化物である可能性があるため、精製 TC と 1 をインキュベートして生成物を確認し、合わせて報告する予定である。

【文献】1) T. Sato, T. *et al.*, *JACS*, 2011, 133, 9734. 2) T. Sato, *BBB*, 2013, 77, 1155. 3) T. Sato, T. *et al.*, *JACS*, 2011, 133, 17540. 4) D. Ueda, *et al.*, *JACS*, 2013, 135, 18335. 5) 上田ら、農芸化学会 2016

Terpenoid, Terpene synthase, Bacillus subtilis natto

発表責任者：佐藤努（satot@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：3C11p13
講演日時：3 月 19 日 17:20～ C 校舎 11 会場

# ポリエンを生合成する II 型ポリケタイド合成酵素の in vitro 解析

# In vitro analysis of a type II polyketide synthase responsible for polyene biosynthesis

○杜 丹ヤオ[1]、勝山 陽平[1]、新家 一男[2]、大西 康夫[1] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]産業技術綜合研究所)
○Danyao DU[1], Yohei KATSUYAMA[1], Kazuo SHIN-YA[2], Yasuo OHNISHI[1] ([1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., Univ. of Tokyo, [2]AIST)

【背景と目的】Ishigamide はポリエン骨格を有するポリケタイドであり、そのポリエン骨格は II 型 polyketide synthase (PKS)により合成されると予想される (Fig. 1)。[1] そのうちの ketosynthase (KS, Iga11) と chain length factor (CLF, Iga12) は系統樹解析において、芳香族ポリケタイドの合成に関与する典型的な II 型 PKS の KS、CLF とは異なるクレードに分類された。これらの新しいクレードに属する KS と CLF は高度に還元されたポリケタイドの生合成を担う新規な II 型 PKS であると考え、その機能解析を行うことにした。

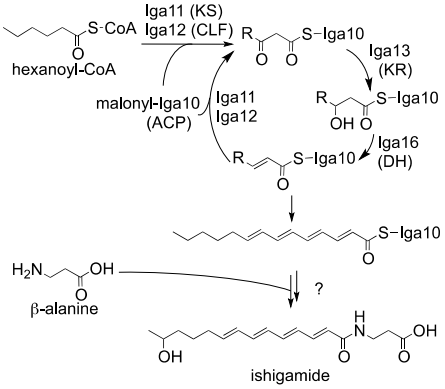


Fig. 1 ishigmaideの推定生合成経路

【方法と結果】*In vitro* 解析を行うため、大腸菌を用いて、Iga11-Iga12 複合体、acyl carrier protein (ACP, Iga10)、ketoreductase (KR, Iga13)、dehydratase (DH, Iga16) を組換えタンパク質として調製した。有機合成した基質アナログを用いた *in vitro* アッセイにおいて、Iga13 は NADPH を補酵素とし、3-oxooctanoyl-NAC のβ-ケト基を立体特異的に *R* 体の水酸基に還元する活性を示した。また、Iga16 は Iga13 の酵素反応により生産される(3*R*)-hydroxyoctanoyl-NAC の脱水を触媒した。Iga11-Iga12 複合体の活性を調べるため、上記の組換えタンパク質すべてを用いて *in vitro* アッセイを行った。さらに、*Streptomyces coelicolor* A3(2)由来の malonyl-CoA transferase を反応系に加えることで、Iga10 のマロニル化を行った。基質には malonyl-CoA と hexanoyl-CoA / hexanoyl-NAC を用いた。反応液を TCA 沈殿し、Iga10 に付いているポリケタイド鎖をアルカリ分解により切り離し、逆相 LC-ESIMS および逆相 LC-APCIMS 分析に供した。その結果、すべての組換えタンパク質を含む反応系においてのみ、3 つの化合物の生成が観察された。これら 3 つの生成物の UV 吸収スペクトルの極大吸収波長は保持時間が長いものほど長く、化合物の二重結合の共役系の長さが異なることが示唆された。また、保持時間が最も長い化合物の UV 吸収スペクトルは ishigamide のものと類似していた。以上のことから、これらの化合物は異なる回数の伸長サイクルを経たポリケタイド-ACP 中間体から切り離されたジエン、トリエン、テトラエン構造を有する不飽和脂肪酸であると考えられた。現在、GC-MS 解析等によるポリエン構造の同定を試みている。

[1] Du *et al.*, **2016**, *Chembiochem, 17*, 15

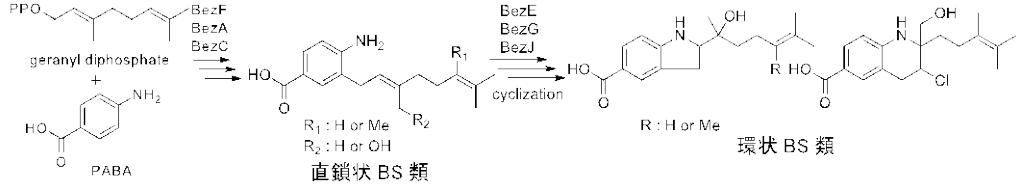
biosynthesis, type II polyketide synthase, polyene

講演番号：3C11p14
講演日時：3 月 19 日 17:35～ C 校舎 11 会場

# ベンザスタチン類生合成におけるテトラヒドロキノリン環およびインドリン環形成機構の解析
# Analysis of the mechanism for forming tetrahydroquinoline and indoline structures in benzastatin biosynthesis

○堤 隼馬[1]、勝山 陽平[1]、新家 一男[2]、大西 康夫[1] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]AIST)
○Hayama Tsutsumi[1], Yohei Katsuyama[1], Kazuo Shin-ya[2], Yasuo Ohnishi[1] ([1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., Univ. of Tokyo, [2]AIST)

【背景・目的】 ベンザスタチン (BS) 類はテトラヒドロキノリン骨格、インドリン骨格など多様な構造を有する化合物群であり、抗細菌活性、抗ウィルス活性など多様な生物活性を有している。[1, 2] 我々はこれまでに BS 類の構造的な特徴に着目して生合成研究を行い、BS 類生合成遺伝子クラスターの同定と *S. lividans* 異種発現系を用いた生合成遺伝子の機能解析により BS 類生合成経路を提唱している (図)。[3, 4] この生合成経路にて興味深い反応が BezE, BezG, BezJ による環化である。BezJ による直鎖状 BS 類のアミノ基の水酸化、BezG の触媒する *O*-アセチル化による *N*-アセトキシ基の形成、BezE による *N*-アセトキシ基の脱離の促進により環化が引き起こされ、テトラヒドロキノリン骨格、インドリン骨格が形成されると推測される。[4] 本研究ではこの環化機構を実験的に示すことを試みた。




図：推定ベンザスタチン類生合成経路

【結果・考察】BezJ は直鎖状 BS 類ではなく、その前駆体である *p*-aminobenzoic acid (PABA) のアミノ基を水酸化する可能性も考えられた。そこで、PABA のアミノ基が水酸化された *p*-(hydroxyamino) benzoic acid (PHABA) を有機合成し、この化合物を直鎖状 BS 類のみを生産する *S. lividans* :: *ΔbezJ* 株の培養液に添加したところ、環状 BS 類の生産が回復した。このことから、PHABA が環状 BS 類の生合成中間体であり、BezJ が PABA のアミノ基の水酸化を行うことが示唆された。次に BezG によるアセチル化反応を *in vitro* にて検証した。PHABA を基質に BezG 反応を行い、LC-MS 解析を行った結果、新たな化合物のピークが検出された。この化合物は、UV 吸収スペクトルおよび MS/MS 解析から、PHABA がアセチル化された化合物であることが明らかとなった。一方、BezG は PABA のアセチル化反応を触媒しなかった。現在、BezG の詳細な機能解析を行うとともに、他の BS 類生合成酵素も用いて、*in vitro* にて環化反応を再構築することを試みている。

【文献】1) Motohashi, K, *et al*. *J. Antibiot* 64, 281 (2011); 2) Hirota-Takahata, Y, *et al*. *J. Antibiot,* **69,** 747–753 (2016); 3) 林ら, 2012 年度日本放線菌学会大会要旨集, 62 (2012); 4) 堤ら, 2015 年度日本放線菌学会大会要旨集, 97 (2015)

biosynthesis, natural products, secondary metabolites

講演番号：3C11p15
講演日時：3 月 19 日 17:50～ C 校舎 11 会場

リベロマイシン生合成に関わる酸化還元酵素 RevM の機能解析
Functional analysis of RevM involved in reveromycin biosynthesis
○鬼頭 奈央子[1]、高橋 俊二[1]、宮澤 岳[1]、前島 希[1]、田中 美帆[1]、室井 誠[1]、奥村 英夫[2]、熊坂 崇[2]、長田 裕之[1] ([1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[2]高輝度光科学研究センター)
○Naoko Kito[1], Shunji Takahashi[1], Takeshi Miyazawa[1], Nozomi Maeshima[1], Miho Tanaka[1], Makoto Muroi[1], Hideo Okumura[2], Takashi Kumasaka[2], Hiroyuki Osada[1] ([1]Chem. Biol., RIKEN CSRS, [2]JASRI)

【目的】Reveromycin A (RM-A)は、破骨細胞選択的に低濃度でアポトーシスを誘導する活性を有し、RM-A 生合成の最終過程にはユニークな 3 級水酸基のサクシニル化反応が存在する。これまでに、3 つの酵素 RevK、RevL、RevM による複合反応が進行することが分かっている。RevL はアデニル化ドメインを持っており、フマル酸と ATP から fumaroyl-AMP を生成すると予想される。また、RevM は、酸化還元酵素と相同性を有していることから、fumaroyl-AMP を succinyl-AMP に還元する反応が予想されるが、中間産物は同定できていない。これまでに RevL 上の酵素反応も予想し、RevL 結晶構造解析を試みてきたが、fumaroyl-AMP や succinyl-AMP を含む共結晶化には成功していない。以上の背景から、本研究では、RevL 基質複合体の調製条件を検討するとともに、生化学的に RevM の機能解析を行うことを目的とした。
【方法および結果】RevM 反応を解析するためには、第一に予想中間体である RevL-fumaroyl-AMP 複合体を調製する必要がある。そこで、大腸菌 BL21(DE3)star に pET28b-His8-revL を導入し His-tag 融合タンパク質として RevL の異種発現及び精製を行った。Kanamycin (50 $\mu$ g/ml) を含む TB 培地 (100 ml) で 37℃培養し、OD600 0.4-0.5 まで増殖後、18℃で 18 時間発現誘導を行った。菌体を回収し超音波破砕を行った後、Ni-NTA カラムクロマトグラフィーにより精製を行った。RevL 精製標品及びフマル酸、Mg、ATP 存在下で反応した RevL を用いて二次元電気泳動を行ったところ、反応後のサンプルは移動度が変化していた。このことは RevM の反応に必要な基質は、RevL 上に存在することを示唆していた。そこで、MonoQ カラムを用いて RevL-fumaroyl-AMP 複合体を精製した。さらに、精製 RevM をもちいて NAD(P)H の存在下で RevL-fumaroyl-AMP 複合体と混合し、還元反応を生化学的に解析した結果を報告する。

Reveromycin A, Streptomyces, Biosynthesis

講演番号：3C11p16
講演日時：3 月 19 日 18:05～ C 校舎 11 会場

# リベロマイシン生合成に関わる RevM の結晶構造解析
# Crystal structure of RevM involved in reveromycin biosynthesis

○奥村 英夫[1]、鬼頭 奈央子[2]、高橋 俊二[2]、宮澤 岳[2]、熊坂 崇[1]、長田 裕之[2] ([1]高輝度光科学研究センター、[2]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー)
○Hideo OKUMURA[1], Naoko KITO[2], Shunji TAKAHASHI[2], Takeshi MIYAZAWA[2], Takashi KUMASAKA[1], Hiroyuki OSADA[2] ([1]JASRI, [2]Chem. Biol., RIKEN CSRS)

【目的】Reveromycin A (RM-A) は放線菌 *Streptomyces reveromyceticus* が生産するポリケチド化合物である。これまでに、生化学・結晶構造解析から生合成中間体 RM-T は P450revI により 3 級水酸基を持つ RM-T1 に変換されることを明らかにしている。最終反応の RM-T1 から RM-A のサクシニル化反応は、合成化学的アプローチでは 1.5 GPa (15,000 気圧) という超高圧条件が必要なエステル化反応であるが、RevK、RevL、RevM の 3 つの酵素により反応が進行することを生化学的に明らかにしている。本研究では、酸化還元酵素 RevM の結晶構造解析により複合酵素反応を理解することを目的とした。

【方法および結果】

RevM の構造は X 線結晶構造解析法で決定した。まず、放線菌 *Streptomyces lividans* TK23 に pWHM3-$P_{TipA}$-His8-revM を導入し、His-tag 融合 RevM として異種発現を行った。培養は SK2 培地で 24 時間行い、その後 18 時間チオストレプトン誘導を行った。放線菌を回収し、破砕・抽出後、遠心分離上清を Ni-NTA カラムに添着し精製を行った。トロンビンにより His-tag を除去した後、MonoQ カラム精製を行い、主ピークを回収した。得られた精製酵素を用いて結晶化スクリーニングを行ったところ、PEG を沈殿剤とした条件で RevM 結晶を得た。引き続き、放射光施設 SPring-8 BL41XU にて回折測定を行い、2.6 Å 分解能の回折データを収集した。本結晶は空間群 $P6_122$ に属し、格子定数 $a$ = 91 Å, $c$ = 432 Å を有していた。位相決定は根粒菌由来 Quinone Oxidoreductase をモデル分子とした分子置換法にて行い、構造構築と精密化を進めた。

RevM の全体構造としては、結晶中でホモ二量体構造をとっており、ヌクレオチド結合タンパク質によく見られる、α ヘリックスと β シートが交互に現れる Rossmann fold 構造、および Quinone Oxidoreductase 特有の構造を有していた。また、精製酵素を用いたゲルろ過クロマトグラフィーより、RevM は二量体として挙動することが示唆されていたが、結晶構造中では、二量体の接触面において両 RevM 分子の β シート構造が相互作用し、連続した β シート構造を形成していた。

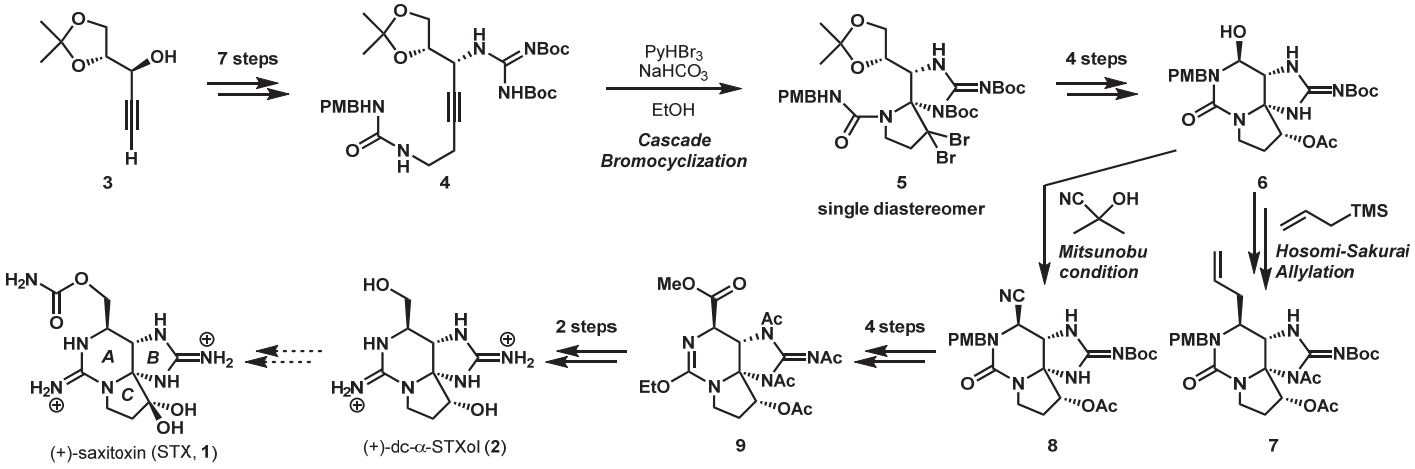
Natural product biosynthesis, succinylation of tertiary alcohol, X-ray crystallography

発表責任者：奥村 英夫（okumurah@spring8.or.jp）

講演番号：3C12a01
講演日時：3 月 19 日 09:20～ C 校舎 12 会場

カスケードブロモ環化反応を用いた saxitoxin 骨格の新合成戦略： (+)-decarbamoyl-α-saxitoxinol の全合成
A New Synthetic Strategy for Saxitoxin Skeleton by a Cascade Bromocyclization: Total Synthesis of (+)-Decarbamoyl-α-Saxitoxinol
○上野 壮平、中崎 敦夫、西川 俊夫（名大院生命農）
○Sohei UENO, Atsuo NAKAZAKI, Toshio NISHIKAWA (Nagoya Univ.)

【背景と目的】サキシトキシン (STX, **1**)は、麻痺性貝毒として知られるグアニジンアルカロイドであり、電位依存性ナトリウムチャネル (VGSC)を特異的かつ強力に阻害する。VGSC には 9 つのサブタイプが存在することが知られているが、その詳細な機能は明らかとなっていないため、サブタイプ選択的阻害剤の開発が望まれている。そこで本研究では、サブタイプ選択的な VGSC 阻害剤の開発を目指し、多様な類縁体合成を指向した効率的な STX 骨格構築法の開発を目的とした。
【方法と結果】既知の光学活性アルコール **3** を出発原料とし、グアニジノ基およびウレア基を導入した環化前駆体 **4** へと導いた。得られた **4** に対して $PyHBr_3$ を作用させたところ、独自に設計したカスケードブロモ環化反応が進行し STX の BC 環を含むスピロアミナール **5** の合成に成功した。次に、*gem*-ジブロモメチレンの酸素官能基化と 1,2-ジオールの酸化的開裂を行うことで *N,O*-アセタール **6** へと導いた。続いて、**6** に対する細見・櫻井アリル化によりアリル化体 **7**、光延条件によりニトリル **8** をそれぞれ合成した。**7** と **8** のアリル基とニトリルは種々の変換が可能であり、これらを起点として多様な STX 類縁体の合成が期待できる。最後に **8** から **2** の全合成を検討した。**8** のニトリルの加水分解とメチルエステル化、ウレアの *O*-エチル化によりイソウレア **9** へと変換した。最後に、エステルの還元と Ac 基の脱保護、イソウレアのグアニジノ化を行うことで **2** の全合成を達成した[1]。現在、**1** やその他の類縁体合成を検討中である。




(1) Ueno, S.; Nakazaki, A.; Nishikawa, T. *Org. Lett.* **2016**, accepted.

saxitoxin, total synthesis, cascade reaction

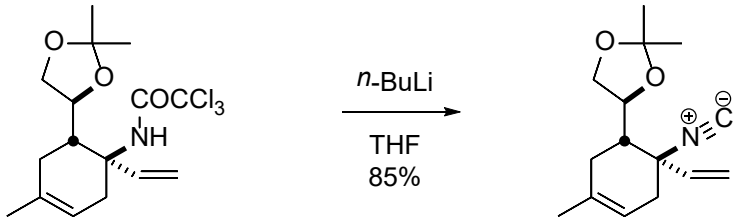
発表責任者：西川俊夫（nisikawa@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3C12a02
講演日時：3 月 19 日 09:35～ C 校舎 12 会場

トリクロロアセトアミドからイソニトリルへの新規な一段階変換反応
A Novel One-step Transformation of Trichloroacetamide into Isonitrile
○宮坂 忠親、橋本 穂果、安立 昌篤、西川 俊夫 (名大農)
○ Tadachika MIYASAKA, Honoka HASHIMOTO, Masaatsu ADACHI, Toshio NISHIKAWA (Nagoya Univ.)

【目的】イソニトリルは、イソシアノ基を有する化合物であり、Ugi 反応や Passerini 反応などの多成分連結反応に有用な合成中間体でもある。また、天然からも興味深い生理活性を持つイソニトリルが多数単離されている。我々は、テトロドトキシン類縁体の合成研究において、偶然イソニトリルの新規合成法を見出した。すなわち、アミンの保護基であるトリクロロアセトアミドに対して塩基を作用させると、イソニトリルに一段階で変換された。このような変換反応はこれまでに報告されておらず、我々はこの新規反応の最適条件や基質の適用範囲そして反応機構について検討した。

【方法および結果】トリクロロアセトアミドに、THF 中低温で *n*-BuLi を作用させると、イソニトリルが収率良く単一の生成物として得られることが明らかとなった。また、エポキシドやアセタール、シリル基などを持つ基質に対しても、反応は円滑に進行した。本反応は、Overman 転位反応と組み合わせることによって、光学活性なイソニトリル化合物を合成する強力な手法になると期待される。




**trichloroacetamide** **isonitrile**

trichloroacetamide, isonitrile, transformation

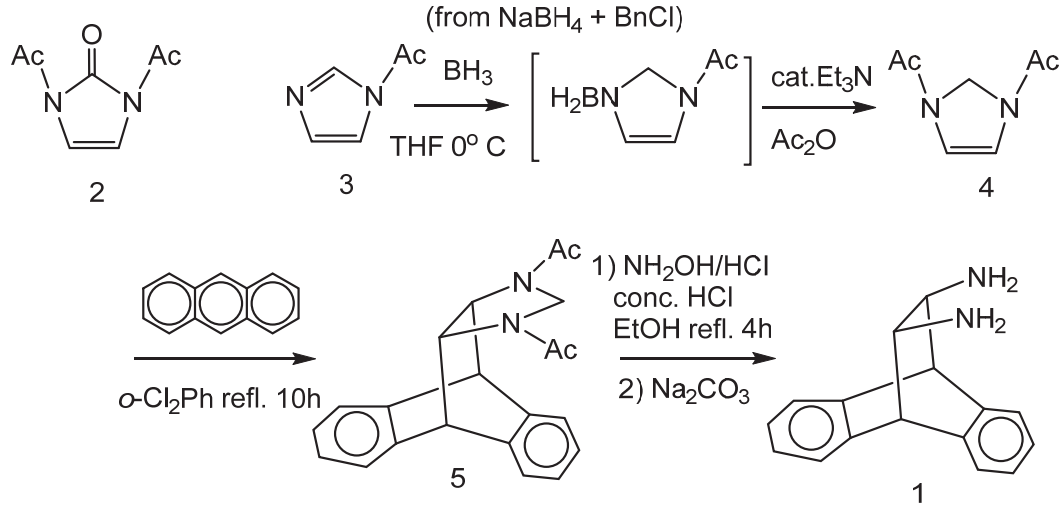
発表責任者：宮坂忠親（miyasaka.tadachika@c.mbox.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3C12a03
講演日時：3 月 19 日 09:50～ C 校舎 12 会場

屋根付き *cis*-ジアミンの調製法
Preparation of roof-shape *cis*-diamine
○福田 怜[1]、福士 幸治[2] ([1]北大農、[2]北大院農)
○Satoshi FUKUDA[1], Yukiharu FUKUSHI[2] ([1]Faculty of Agriculture, Hokkaido Univ., [2]Research Faculty of Agriculture, Hokkaido Univ.)

**目的**　これまで *cis*-11,12-diamino-9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracene **1** の誘導体をキラル配位子とした触媒が数多く報告されている[1)]。本ジアミン **1** は、環状ウレア **2** と anthracene との Diels-Alder 反応生成物から数段階の反応を経て調製されていた[2)]。我々は、*N*-acetylimidazole を出発原料とした合成ルートについて検討した。

**方法と結果**　*N*-Acetylimidazole **3**を反応系内で調製した$BH_3$を用いて還元後、アセチル化して化合物**4**を得た。化合物 **4**とanthraceneとのDiels-Alder反応により化合物 **5**が得られた。化合物**5**は、塩酸酸性条件下での$NH_2OH$/HClによる分解反応後、塩基性にすることで目的物の*cis*-diamine **1**を得ることができた。現在、反応条件の最適化を進めている。




1) *Tetrahedron Lett.*, **57**, 3287-3290 (2016)およびその引用文献。
2) *J. Org. Chem.*, **80**, 9671-9681 (2015)

*cis*-11,12-diamino-9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracene, roof-shape *cis*-diamine

講演番号：3C12a04
講演日時：3 月 19 日 10:05～ C 校舎 12 会場

# 環状デプシペプチドに含有するα,β-dihydroxy-γ-aminoheptanoic acid 誘導体の合成

# Synthesis of α,β-dihydroxy-γ-aminoheptanoic acid derivatives, component of cyclic depsipeptides

○東海林 由憲、吉野 諒、今野 博行（山形大院理工）
○Yoshinori TOKAIRIN, Ryo YOSHINO, Hiroyuki KONNO (Yamagata Univ.)

α,β-Dihydroxy-γ-aminoheptanoic acid 誘導体は海綿由来の環状デプシペプチド類によく見られるビルディングブロックである。環状デプシペプチド類は強力な抗菌、抗腫瘍、抗 HIV 活性を示すものが存在し、その全合成ならびに構造活性相関研究により、新たな薬剤リード化合物の開発が期待されている。しかし、非タンパク性アミノ酸が多く含有する複雑な構造故に、全合成例はわずか数例が報告されているのみである。そのため当研究室でも構造活性相関研究を見据えた効率的な全合成ルートの開発を目指している。今回、構成する異常アミノ酸の中でも特にユニークなアミノ酸であるα,β-dihydroxy-γ-amino heptanoic acid 誘導体の合成を報告する。

本異常アミノ酸はこれまでに、3 種類の誘導体が様々なデプシペプチドに含まれていることが確認されている(Fig. 1)。よってこれら 3 種の誘導体の合成に共通して用いることのできる戦略を立てた。また、構造活性相関を容易にすべく Fmoc 固相合成法での環状ペプチド類の全合成を計画しているため、アミノ基を Fmoc 基、側鎖官能基を酸条件下で脱保護が可能な保護誘導体を合成の目標とした。以下に(2*R*, 3*R*, 4*S*)-4-amino-2,3-dihydroxyheptan-1,7-dioic acid (ADH, **1**) の Fmoc 誘導体 Fmoc-ADH(acetonide, *t*Bu)-OH (**4**) の合成を示す(Scheme 1)。Fmoc-Glu(*t*Bu)-OH を出発原料に合成を検討した。福山還元を用いてアミノアルデヒド(**5**)を調製し、*Z*選択的ホーナーエモンズ反応により *Z* オレフィン(**6**)を合成した。次の $OsO_4$ を触媒としたジヒドロキシル化は 3:1 のジアステレオマー比で望む化合物(**7a**)を与えた。さらに保護基の着脱により **4** の合成に成功した。本手法の優れている点は塩基に不安定な Fmoc 基を維持したまま官能基の変換を行えることであり、わずか 6 工程で目的の化合物を得ることができる。また、本手法を応用した 4-amino-7-guanidino-2,3-dihydroxyheptanoic acid (AGDH, **3**) の合成も合わせて発表する。

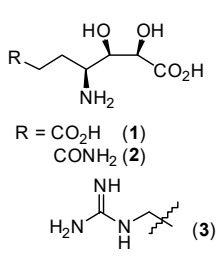
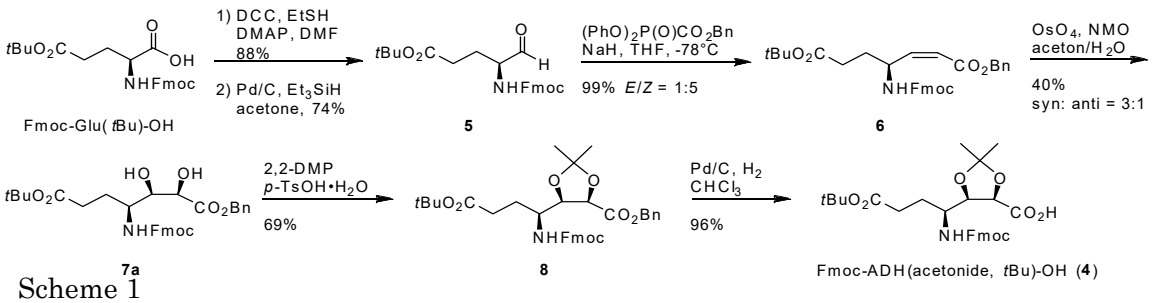



Fig. 1




Scheme 1

unusual amino acid, cyclic depsipeptide, dihydroxylation of Z-olefin

発表責任者：東海林　由憲（tca74888@st.yamagata-u.ac.jp）

講演番号：3C12a05
講演日時：3 月 19 日 10:20～ C 校舎 12 会場

# １段階反応による糖ヌクレオチドの合成

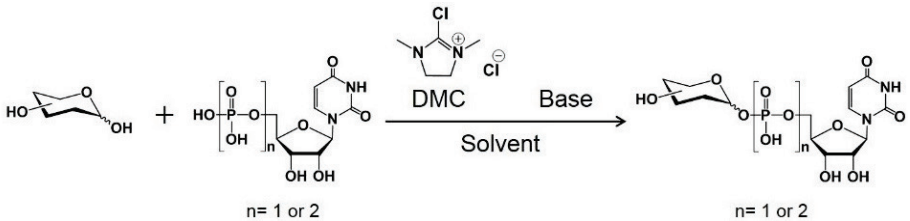
# One-step synthesis of sugar-nucleotides

○宮川 淳、外山 沙那実、山村 初雄（名工大工）
○Atsushi MIYAGAWA, Sanami TOYAMA, Hatsuo YAMAMURA (Nagoya Inst. of Tech.)

糖脂質や配糖体、多糖などの生合成は、糖の活性型である糖ヌクレオチドを供与体として用いた酵素による糖転移反応によって、特定の受容体に糖を付加することで行われている。このようにグリコシド結合を構築するための原料として重要な糖ヌクレオチドは、酵素反応による糖鎖合成や類縁体による酵素阻害剤を構築する上で、重要な基質である。

糖ヌクレオチドは、糖のアノマー位とヌクレオシドの一リン酸、または二リン酸を介して結合した構造をしており、その結合様式はα結合またはβ結合のどちらかが選択的に存在している。これまでの糖ヌクレオチドの化学合成法として、ホスホロアミダイト法によって活性化したヌクレオシド一リン酸と糖一リン酸をカップリング後に酸化反応を行い、二リン酸へと誘導する方法や、糖一リン酸とヌクレオシド一リン酸を縮合反応により二リン酸を構築する方法がある。または、糖のアノマー位をハロゲン化して、ヌクレオシド二リン酸と結合反応を行う方法がある。どちらの方法も多段階反応により糖に保護基を導入して、二リン酸構築後に脱保護を行う必要があるため、反応段階数の増加やそれに伴う収率の低下などが問題となる。さらに高極性かつ不安定な糖ヌクレオチドのクロマトグラフィーによる精製が必要なため、合成を行うには困難な点が多くある。

そこで、本研究では保護基を用いない、簡便な糖ヌクレオチドの新規合成法として、縮合剤 DMC を利用した無保護の単糖とヌクレオシド二リン酸の縮合反応によって、１段階反応による合成方法の検討を行った。HPLC を利用した分析により、反応条件の検討を行い、最適な条件（温度：氷浴、塩基：TEA、溶媒：H2O-MeCN）を明らかにして、目的とする糖とヌクレオシドリン酸の結合反応に成功した。また、困難が予想された無保護体である高極性の目的物の単離には、順相シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて行い、１段階の精製によって単離に成功した。この合成法を用いて得られた UDP-Glc、UMP-Glc、UDP-Man、GDP-Man の構造解析を NMR によって行ったところ、非天然型であるβ結合によって UDP または UMP と Glc が結合していることが明らかになった。一方、UDP-Man および GDP-Man は、天然型であるα結合によって、UDP と Man が結合しており、この反応では 1,2-trans 型のみが得られた。さらなる糖ヌクレオチドの合成を行い、本大会において報告を行う。




synthesis, sugar, nucleotide

発表責任者：宮川淳（miyagawa.atsushi@nitech.ac.jp）

講演番号：3C12a06
講演日時：3 月 19 日 10:45～ C 校舎 12 会場

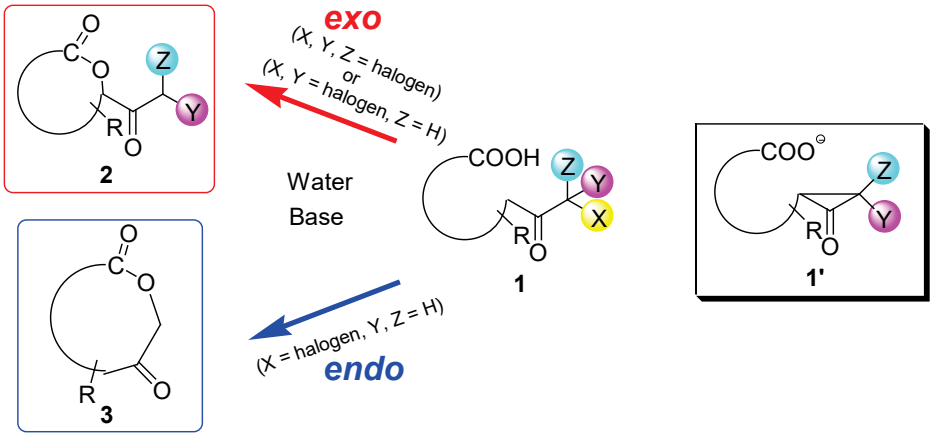
# 環境調和型水中ラクトン合成法の開発－ケト酸の新規脱ハロラクトン化反応－

# Development of the green aqueous lactone synthesis method －New dehalolactonizations of keto acids－

○知名 秀泰、小島 悠輔、天野 雄太、土肥 寿文（立命館大薬）
○ Hideyasu CHINA, Yusuke KOJIMA, Yuta AMANO, Toshifumi DOHI (College of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University)

【目的】ラクトン類は生物活性を示すものが多く、その環構造の形成は医薬品開発を志向する上で重要なプロセスとなっている。縮合型の著名な人名反応が既にラクトン合成で用いられているが、二量化を抑えるための希釈条件の設定、化学量論量以上の試薬、及び禁水操作の手間が必要となっており、グリーンケミストリーの観点から試薬や溶媒などの廃棄物量低減を目的とした改良が望まれている。このような中、我々は高濃度の基質存在下および水やアルコールなどのプロトン性溶媒存在下で利用可能な環境調和型ラクトン合成法の開発に着手した。

【方法・結果】ハロゲン化酵素の活性評価に用いられるモノクロロジメドン（MCD）測定法 [1] を詳細に調べ、測定中で起こった分解反応の解析から温和な水中条件下で進行するケト酸 **1** の脱ハロラクトン化反応を見出した。[2] また、*exo* 環化型ラクトン **2** と *endo* 環化型ラクトン **3** の生成が基質 **1** のハロゲン原子置換基数により制御でき、常温・弱アルカリ性（pH10）条件下で反応が進行することを見出した。更に、重水素交換実験による反応機構解析から分子内カルボキシ基のプロトン引抜き効果を明らかにし、本反応における高活性中間体としてシクロプロパノン中間体 **1'**を決定した。本法の更なる効率化と基質汎用性について述べる。




1) C. Wagner, I. M. Molitor, G. M. Kcnig, *Photochemistry* **2008**, *69*, 323.
2) H. China, Y. Okada, T. Dohi, *Asian J. Org. Chem.* **2015**, *4*, 1065.

dehalolactonization, keto acid, cyclopropanone intermediate

発表責任者：知名 秀泰（hchina7a@fc.ritsumei.ac.jp）

講演番号：3C12a07
講演日時：3 月 19 日 11:00～ C 校舎 12 会場

# Diphenyl Phosphorazidate を用いたアルドキシムからテトラゾールの効率的合成

# An Efficient Synthesis of 5-Substituted 1H-Tetrazoles from Aldoximes using Diphenyl Phosphorazidate

○石原 稿太朗[1]、川島 麻友美[1]、塩入 孝之[1]、松本 高利[2]、松儀 真人[1] ([1]名城大農、[2]東北大理)
○Kotaro ISHIHARA[1], Mayumi KAWASHIMA[1], Takayuki SHIOIRI[1], Takatoshi MATSUMOTO[2], Masato MATSUGI[1] ([1]Meijo Univ., [2]Tohoku Univ.)

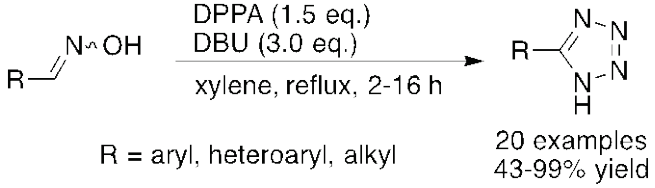
テトラゾールは五員環性の芳香族複素環式化合物であり、その構造の特異性から様々な分野で研究が行われている。特に、医薬化学においてはカルボン酸の生物学的等価体として働くことから、医薬品の部分構造に汎用されている。

一般にテトラゾールはアジド化合物とニトリル化合物の触媒的 [3+2] 環化付加反応により合成される。近年では、銅やインジウム触媒を用いてアルドキシムまたはアルデヒドからテトラゾールを合成する報告がなされているが、これらの方法は毒性をもつ金属試薬や爆発性があるアジド源を必要とする[1)]。

一方、アジド化剤であるジフェニルリン酸アジド (DPPA) はリン原子の作用によりアジドが安定化されていることから爆発性がなく、取り扱いが容易である。これまでに、我々は DPPA をアジド源として用いるアルドキシムからのテトラゾール合成を見出している[2)]。本反応では、DPPA を用いてテトラゾール環を構築することで、より安全かつ簡便なテトラゾール合成が可能になった。

しかしながら、前回の報告ではかさ高い置換基を有した基質や脂肪属アルドキシムを基質に用いた際、長い反応時間を必要としたり、目的生成物の収率が低下したりする問題があった。その原因として、溶媒であるトルエンの沸点が反応温度として不十分であると考えられた。そこで、本研究では反応条件の改良を行い、反応時間の短縮化並びに収率の向上を試みた。その結果、沸点の高い溶媒であるキシレンを用いてより高温条件で反応を行ったところ、反応時間の短縮及び従来反応が進行しにくかった基質における収率の向上に成功した。

本反応は毒性をもつ金属試薬や爆発性のあるアジド化合物を必要とせず、短時間かつ高収率で反応が進行することから実用性の高いテトラゾール合成法であると考えている。




【References】

1) (a) Patil, U. B. *et al. Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 3706. (b) Heravi, M. M. *et al. Synlett* **2012**, *23*, 2927. (c) Akula, R. K. *et al. Lett. Org. Chem.* **2014**, *11*, 440. (d) Abdollahi-Alibeik, M. *et al. New J. Chem.* **2015**, *39*, 2116. (e) Guggilapu, S. D. *et al. Synlett* **2016**, *27*, 1241.
2) Ishihara, K *et al. Synlett* **2016**, *27*, 2225.

Diphenyl Phosphorazidate, aldoxime, tetrazole

講演番号：3C12a08
講演日時：3 月 19 日 11:15～ C 校舎 12 会場

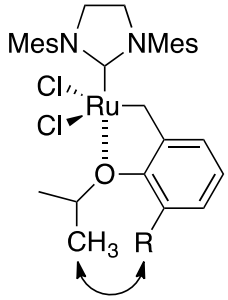
# 分子内立体ひずみを利用した高活性型 Grubbs-Hoveyda メタセシス触媒の開発

# Development of Highly Activated Grubbs-Hoveyda Metathesis Catalyst Driven by Intramolecular Steric Strain

○下脇 健斗、五十嵐 里奈、小林 佑基、杉山 祐也、塩入 孝之、松儀 真人 (名城大農)
○ Kento SHIMOWAKI, Rina IGARASHI, Yuki KOBAYASHI, Yuya SUGIYAMA, Takayuki SHIOIRI, Masato MATSUGI (Meijo Univ.)

【目的】

メタセシス反応は二つの炭素–炭素二重結合部位を脱エチレン化し、新たな二重結合を形成する重要な触媒反応であり、一般に Grubbs-Hoveyda 2nd generation **1a** が触媒として汎用されている (**Figure 1**) [1]。当研究室では、触媒 **1a** のリガンド部位での分子内 CH/π 相互作用を利用することで、分子配座を制御した、より活性の高い触媒の開発を試みてきた。密度汎関数法による分子軌道計算の結果、リガンド部位のイソプロポキシ基のオルト位に 9-anthracenyl 基を導入した触媒 **1b** がこの目的にあった触媒だと考えられ、実際に **1b** が閉環メタセシス反応に対して **1a** より高活性な触媒であることを見出している。




**1a** : R = H
**1b** : R = 9-anthracenyl

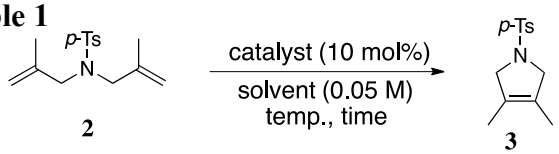
**Figure 1**

今回演者は、フルオラス溶媒中で触媒 **1b** を用いた閉環メタセシス反応をおこなえば、濃度圧縮効果により触媒活性が向上する可能性があると考え、反応条件を精査した。

【実験と結果】

四置換型オレフィンを与えるジエン体 **2** を基質としたメタセシス反応をおこなった (**Table 1**)。ジクロロメタン中で **1a** を用いた場合には、24 時間で閉環体 **3** への変換率が 5 % であったのに対して、**1b** 使用時には、75 % の変換率であった (entries 1, 2)。フルオラス溶媒である perfluorotoluene (PFT) 中で [2]、基質濃度を 0.1 M に設定したところ、2 時間で変換率が 97 % となり、87 % の収率で閉環体を単離することができた (entry 3) [3]。

**Table 1**




| entry | catalyst | solvent | temp. (°C) | time (h) | conv. (%)[a] |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | **1a** | $CH_2Cl_2$ | reflux | 24 | 5 |
| 2 | **1b** | $CH_2Cl_2$ | reflux | 24 | 75 |
| 3[b,c] | **1b** | PFT | 60 | 2 | 97(87)[d] |

[a] Determined by $^1$H NMR spectroscopy.
[b] The concentration of **1b** was 5 mol%.
[c] Reactant concentration was 0.1 M. [d] Isolated yield.

なお、触媒 **1b** の X 線結晶構造解析及び各種スペクトル測定の結果は、イソプロポキシ基と anthracenyl 基との間で分子内 CH/π 相互作用が働いていることを示唆しており、本相互作用に起因する立体ひずみが本触媒の高活性化に大きく寄与しているものと考えている。

【参考文献】 1) Hoveyda, A. H. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8168. 2) Fuentes, A. *et al. Chem. Rev.* **2015**, *115*, 871. 3) Matsugi, M. *et al. Synlett* **2016**, *27*, 2352.

fluorous solvent, steric strain, metathesis

講演番号：3C12a09
講演日時：3 月 19 日 11:30～ C 校舎 12 会場

# ユビキタス鉄サレン錯体を用いる孤立オレフィンの不斉エポキシ化反応: 基質汎用性と反応機構の考察

# Asymmetric Epoxidation of Isolated Olefins Using Ubiquitous Iron Salen Complex: Substrate Scope and Consideration of Reaction Mechanism

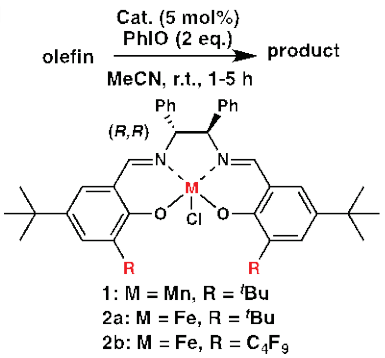
○杉山 祐也、宮崎 裕紀、宮田 一誠、榊原 有希、小林 佑基、塩入 孝之、松儀 真人 (名城大農)
○Yuya SUGIYAMA, Hiroki MIYAZAKI, Issei MIYATA, Yuki SAKAKIBARA, Yuki KOBAYASHI, Takayuki SHIOIRI, Masato MATSUGI (Meijo Univ.)

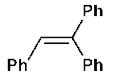
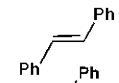
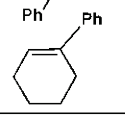
これまでサレン錯体による孤立二重結合の不斉エポキシ化では、マンガンなどの希少金属が用いられており、[1] ユビキタス元素である鉄を利用した報告例はない。ごく最近我々は、サレンリガンド上の 3,3' 位に電子求引性のフルオラスタグ ($C_4F_9$ タグ) と、5,5' 位に電子供与性 $^t$Bu 基を導入した錯体 **2b** [2] を用いれば、中心金属を鉄に置き換えても不斉エポキシ化が首尾よく進行し、Jacobsen 型マンガンサレン錯体 **1** よりも高いエナンチオ面選択性を与えることを見出した (**Table 1, entris 1-3**)。今回我々は、鉄錯体 **2b** を用いる本不斉酸化反応の基質汎用性、並びにその反応機構について考察した。

トランススチルベンを基質として用いた場合、Jacobsen 型マンガンサレン錯体よりも高いエナンチオ面選択性で不斉酸化が進行した（**entry 5**)。[3] 1-フェニルシクロヘキセンにおいては、エナンチオ面選択性は 68%*ee* であったが、その酸化活性は高いことがわかった (**entry 6**)。

本反応機構を明らかにするために、2 種類のシクロプロパン基質を用いてラジカルクロック実験を行った。その結果、シクロプロパン部位は開環せず、両者とも対応するエポキシ体を与えたことから、ラジカル種経由で進行していないことが確認できた (右下図)。また、トリフェニルエチレンの酸化において、酸化剤として TBHP を用いた場合には、エナンチオ面選択性が 11%*ee* と低下したことから (**entry 4**)、活性種はオキソ錯体 (Fe(IV)=O) ではないことが示唆された。[4] 本反応では、ヨードシルベンゼンサレン活性種 [Fe$^{III}$(salen)(OIPh)]を形成後、協奏的、またはカチオン中間体を経由して段階的にエポキシ化が進行している可能性がある。[5]

Table 1




| entry | Olefin | Cat. | conv. (%)[a] | *ee* (%)[b] |
|---|---|---|---|---|
| 1 | | 1 | 100 | 73 (*S*) |
| 2 |  | 2a | No reaction | |
| 3 | | 2b | 63 | 77 (*S*) |
| 4[c] | | | 62 | 11 (*S*) |
| 5 |  | 2b | 61 | 60 (S,*S*) |
| 6 |  | 2b | 100 | 60 (S,*S*) |

(radical clock experiment)

| vinylcyclo propane | conv. (%)[a] | epoxide : ring opening [a] |
|---|---|---|
|  | conv.* 28% (epoxide) SM 72%* | 100 : 0 |
|  | conv.* 36% (epoxide) SM 64%* | 100 : 0 |

a) Detemined by $^1$H NNR.
b) Determined by HPLC (Chiral OD-3 column, Hex/PrOH = 96:4, frow rate, 0.4ml/min.)
c) TBHP was used instead of PhIO.

**References** 1) Review see: Katsuki, T. *et al*. *Synlett* **2003**, *3*, 281.; 2) Matsugi. M. *et al*. *Tetrahedron: Asymmetry* **2014**, 25, 1209.; 3) Jacobsen, E. N. *et al*. *J. Org. Chem*., **1994**, *59*, 4378.; 4) Bandyoparadhyay, D. *et al*. *Chem. Commun.,* **2006**, 4823.; 5) Bryliakov, K. P. *et al*. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2004**, *43*, 5228.

Iron Salen Complex, Asymmetric Epoxidation, Reaction Mechanism

講演番号：3C12p02
講演日時：3 月 19 日 14:15～ C 校舎 12 会場

# Ancorinoside 類の合成研究

# Synthetic study of ancorinosides

○大木 千明、矢島 新、勝田 亮、額田 恭郎（東農大院農）
○Chiaki OHKI, Arata YAJIMA, Ryo KATSUTA, Tomoo NUKADA (Tokyo Univ. of Agriculture)

Ancorinoside A (**1**)は 1997 年 *Ancorina* 属海綿から単離構造決定され、イトマキヒトデの胞胚形成を段階的に阻害する活性が報告された。また ancorinosides B-D は 2000 年に海綿 *Penares sollasi* から単離構造決定され、膜型マトリックス・メタロプロテイナーゼ-1(MT1-MMP)の抑制剤であることが確認されている。さらに ancorinoside B (**2**)はゼラチナーゼ-A (MMP2)を阻害することも報告された。これら ancorinoside 類は共通の構造として二糖、脂肪鎖、D-アミノ酸由来であると考えられるテトラミン酸部位を有する特異な天然有機化合物群である。本研究では入手容易な L-アスパラギン酸誘導体を原料として立体選択的に ancorinoside アグリコンのエナンチオマーを合成し、天然物の絶対立体配置を確認することを目的とした。

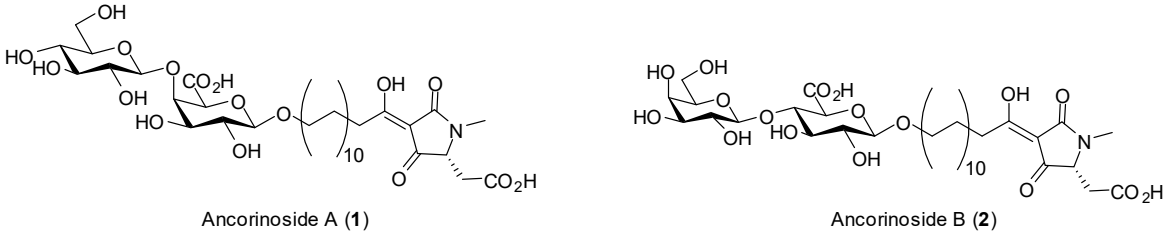



**Figure 1**. Ancorinoside A (**1**) および ancorinoside B (**2**)の構造

Decane-1,10-diol よりメタセシス反応等を経由して脂肪鎖部位(**3**)を合成した。続いて L-アスパラギン酸誘導体(**4**)を縮合した後、Lacey-Dieckmann 環化によりテトラミン酸構造を構築し、続く脱保護にて目的物である ancorinoside アグリコン(**6**)の合成を達成した。合成品と報告されている天然物の比旋光度および CD スペクトルを比較し、天然物の絶対立体配置を確認したので併せて報告する。

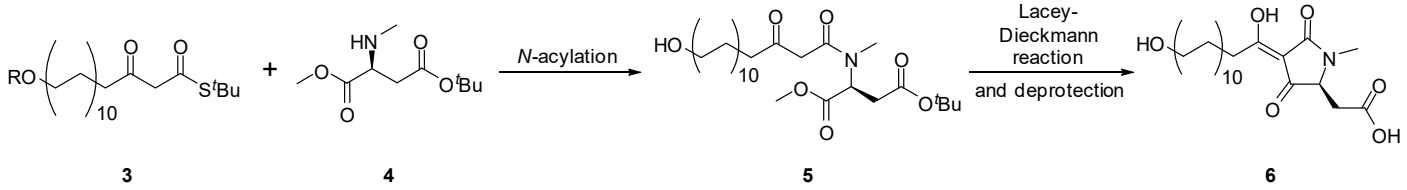



**Figure 2.** Ancorinoside アグリコン **6** の合成

Ancorinosides, Tetramic acid, Stereoselective synthesis

発表責任者：大木千明（44616001@nodai.ac.jp）

講演番号：3C12p03
講演日時：3 月 19 日 14:30～ C 校舎 12 会場

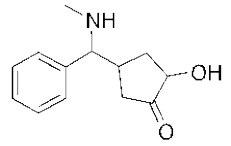
# 青枯病菌のクオラムセンシング物質 HMCP の合成研究

# Synthetic studies of HMCP, a quorum sensing moleclule candidate of *Ralstonia solanacearum*

○橋村 奏[1]、矢島 新[2]、甲斐 建次[3]、勝田 亮[2]、額田 恭郎[2] ([1]東農大院農、[2]東農大応生、[3]阪府大院生命環境)

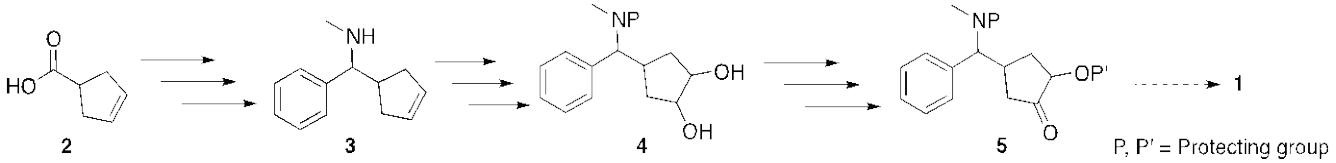
○So HASHIMURA[1], Arata YAJIMA[2], Kenji KAI[3], Ryo KATSUTA[2], Tomoo NUKADA[2] ([1]Graduate School of Agriculture, Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Faculty of Applied Biosciences, Tokyo Univ. of Agriculture, [3]Osaka Prefecture Univ.)

2016 年、Kumar らにより青枯病菌のクオラムセンシング物質として 2-hydroxy-4-[(*N*-methylamino)(phenyl)-methyl]cyclopentanone (以下 HMCP, **1**)の単離、構造決定が報告された[1)]。しかし、類似した化合物の例が知られていないことや、報告にある有機合成の実験手法に疑問点が含まれることから、提唱構造に誤りがあるのではないかと考えた。よって提唱構造を有する化合物を合成し、スペクトルデータを比較することとした。

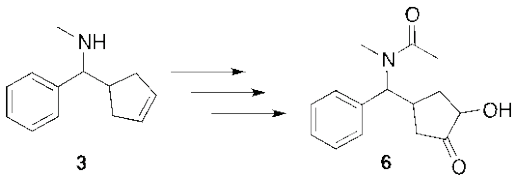



2-Hydroxy-4-[(*N*-methylamino)(phenyl)methyl]cyclopentanone
(HMCP, **1**)

3-シクロペンテンカルボン酸(**2**)から 3 工程で調製した **3** のアミノ基の保護、続くジヒドロキシ化によりジオール **4** とした。次に一方のヒドロキシ基を保護したのち、酸化することで種々の HMCP 誘導体 **5** を得た。保護基を脱保護することにより HMCP (**1**)への誘導を試みたが、生成物が非常に不安定であり単離は困難を極めた。




そこで **3** から合成した *N*-アセチル HMCP (**6**)のスペクトルと報告されているスペクトルデータと比較した結果、両者は全く異なっていたことから提唱構造には誤りがあることが示唆された。




1) J. S. Kumar, S. Umesha, K. S. Prasad, P. Nirajana, *Curr. Microbiol.* **2016**, *72*, 297-305.

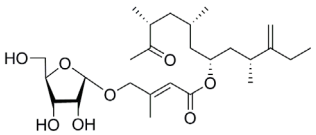
Synthesis, quorum sensing, *Ralstonia solanacearum*

講演番号：3C12p04
講演日時：3 月 19 日 14:45～ C 校舎 12 会場

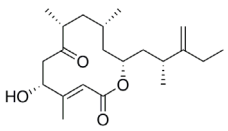
# 渦鞭毛藻から単離された amphidinin 類配糖体部位の合成研究

# Synthetic of studies glycoside moiety of amphidinins isolated from a dinoflagellate

○曽根 実奈美[1]、矢島 新[2]、勝田 亮[2]、額田 恭郎[2] ([1]東農大院農、[2]東農大応生)
○Minami SONE[1], Arata YAJIMA[2], Ryo KATSUTA[2], Tomoo NUKADA[2] ([1]Graduate School of Agriculture, Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Faculty of Applied Biosciences, Tokyo Univ. of Agriculture)

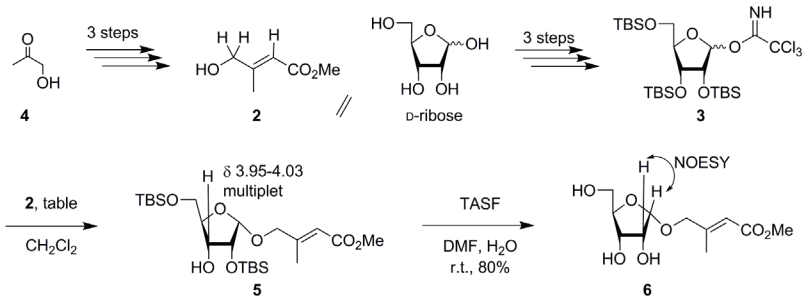



amphidinin D




amphidinolide Q

【序論】Amphidinin 類は海洋中に生息する渦鞭毛藻 *Amphidinium* 属から単離されたマクロリド化合物 amphidinolide Q の構造類縁体である[1]。Amphidinolide Q は生体外マウスリンパ腫 L1210 細胞やヒト上皮癌細胞 KB などの腫瘍細胞に対して細胞毒性を示し、糸状菌 *Trichophyton mentagrophytes* に対して抗菌活性を示す。一方、本研究で注目した amphidinin 類のいくつかは *T. mentagrophytes* に対して抗菌活性を示すが、L1210 細胞やヒト上皮癌細胞には細胞毒性を示さないことから、構造活性相関に興味が持たれる。本研究では amphidinin 類の全合成経路の確立を目的とし、鍵反応となるα選択的グリコシル化反応により重要中間体である配糖体部位の合成について検討することとした。




【結果】ヒドロキシアセトンを出発原料とし、ヒドロキシ基の保護、H.W.E.反応、脱保護により、糖授与体を合成した。次に、D-リボースより、全てのヒドロキシ基をシリル基で保護、もしくは 5 位のみアシル基で保護した糖供与体を合成し、グリコシル化反応について検討したところ、α選択的にリボフラノシドを得ることに成功した。その後、脱保護を経て amphidinin 類配糖体部位の合成を達成した。合成品の NMR スペクトルは、報告されている amphidinin 類の該当部位のスペクトルデータと一致したことから、amphidinin 類がα-リボフラノシド構造を有することが確認できた。

1) Jun'ichi Kobayashi et al., *Org. Lett.,* **2014**, *16,* 5624-5627

Synthesis, Amphidinin, Ribofuranoside

発表責任者：曽根実奈美（44616013@nodai.ac.jp）

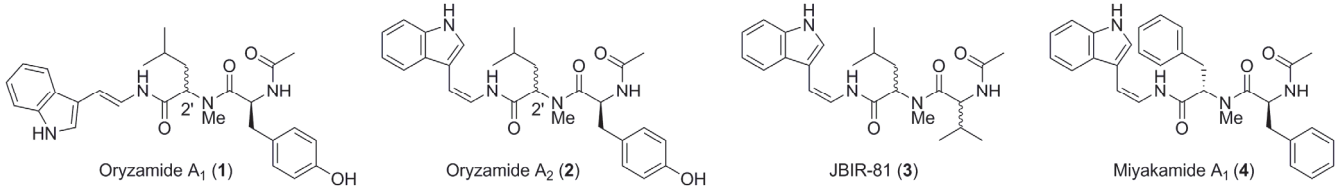
講演番号：3C12p05
講演日時：3 月 19 日 15:00～ C 校舎 12 会場

# Oryzamide A 及び類縁体の合成研究

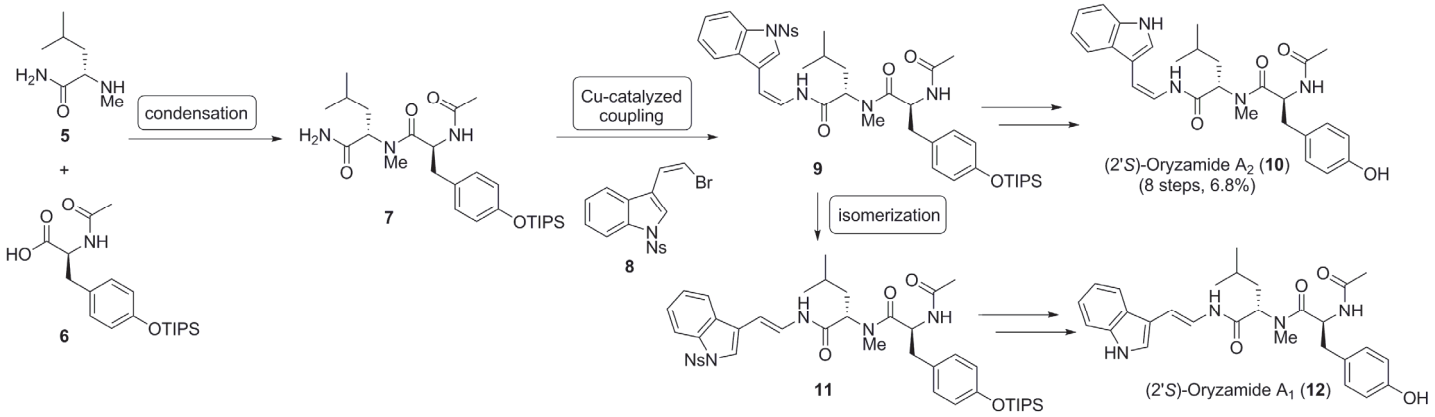
# Synthetic study of oryzamide A and its analogues

○豊田 麻実[1]、勝田 亮[2]、岩佐 幸一[2]、矢島 新[2]、額田 恭朗[2] ([1]東農大院農、[2]東農大応生)
○ Mami TOYODA[1], Ryo KATSUTA[2], Koichi IWASA[2], Arata YAJIMA[2], Tomoo NUKADA[2] ([1]Graduate School of Agriculture, Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Faculty of Applied Biosciences, Tokyo Univ. of Agriculture)

*Aspergillus* 属が生産するペプチドエナミドは、*N* 末端より *N*-アセチルアミノ酸と *N*-メチルアミノ酸、デヒドロトリプタミンが順次結合した構造を有する。これらの化合物群は、抗腫瘍活性や神経保護作用など多様な生物活性が報告されている。筆者らは、既存のペプチドエナミド類合成法では困難であったエナミド部位の効率的かつ立体選択的構築法の開発を目的として研究に着手した。




本化合物群の網羅的合成経路開拓の嚆矢として oryzamide 類を標的とした。Oryzamide $A_1$/$A_2$ は 2012 年に *A. oryzae* から単離されたペプチドエナミドであるが、*N*-MeLeu 残基の立体化学が未決定である。ここで *N*-MeLeu 残基の立体化学を L と仮定し(2'*S*)-oryzamide $A_2$ の合成を試みた。*N*-MeLeu$NH_2$ (**5**)と *N*-AcTyr (**6**)を縮合し、ジペプチド **7** を得た。**7** と臭化ビニル **8** の銅触媒を用いたカップリング反応により、(*Z*)-エナミド **9** の選択的な合成に成功した。続く脱保護により、(2'*S*)-oryzamide $A_2$ (**10**)の初の全合成を L-Tyr より 8 工程、総収率 6.8%で達成した。また、**9** の異性化により得た(*E*)-エナミド **11** を脱保護することにより(2'*S*)-oryzamide $A_1$ (**12**)を合成した。合成した **12** と天然物の $^1$H NMR データの比較により、天然物の 2'位の立体化学を *S* であると決定した。現在、開発した合成経路を用いて類縁体の JBIR-81 (**3**)と miyakamide $A_1$ (**4**)の合成を行っており、その進捗についても併せて報告する。




total synthesis, peptide, *Aspergillus oryzae*

発表責任者：豊田麻実（44616017@nodai.ac.jp）

講演番号：3C12p06
講演日時：3 月 19 日 15:25～ C 校舎 12 会場

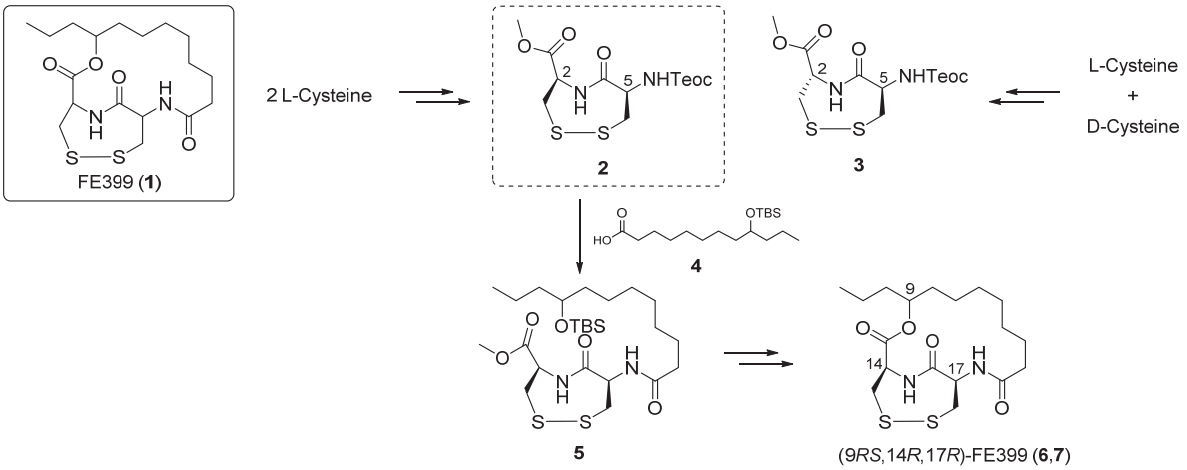
# FE399 の合成と立体化学に関する研究

Synthetic and stereochemical studies of FE399

〇政田 尚子[1]、勝田 亮[2]、矢島 新[2]、額田 恭郎[2] ([1]東農大院農、[2]東農大応生)
〇Naoko MASADA[1], Ryo KATSUTA[2], Arata YAJIMA[2], Tomoo NUKADA[2] ([1]Graduate school of Adriculture, Tokyo University of Adriculture, [2]Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Adriculture)

【目的】FE399(**1**)は糸状菌 *Ascochyta* sp. AJ117309 が生産する、癌細胞に対してアポトーシス誘導活性を示す化合物である[1)]。癌抑制遺伝子の一つである *p53* 遺伝子正常株に比べて *p53* 異常株に対してより高い活性を示すことが報告されている。本化合物はシステイン 2 分子と長鎖脂肪酸からなる環状デプシペプチドであり、3 種の互変異性体の平衡混合物として単離された。本化合物はこれまでに報告された抗腫瘍物質とは異なる構造的特徴を有することから、その構造活性相関や立体化学に興味がもたれる。演者らは合成経路の確立及び、未決定である 3 箇所の立体化学の解明を目的とし合成研究を開始した。

【方法・結果】FE399 (**1**)の合成にあたり、はじめに 8 員環部分の相対立体配置を決定することとした。(2*R*,5*R*)-環化体 **2** 及び(2*S*,5*R*)-環化体 **3** を合成し天然物の $^{1}$H NMR スペクトルと比較したころ、天然物の 8 員環部分と 2*R*,5*R*-体(**2**)が類似していたため、8 員環部分の相対立体配置は *syn* であると推定した。2*R*,5*R*-体(**2**)とラセミ体の脂肪酸 **4** との縮合を経て、椎名マクロラクトン化を行うことにより(9*R*,14*R*,17*R*)-FE399 (**6**)及び(9*S*,14*R*,17*R*)-FE399 (**7**)を混合物の状態で得た。混合物の $^{1}$H、$^{13}$C NMR スペクトル中に天然物の FE399 と一致するピークが観測された。以上のことから FE399 の 8 員環部分の立体化学を図に示すとおり決定するとともに、FE399 の合成経路を開発することに成功した。今後は光学活性体の長鎖脂肪酸を用いた **1** の合成を行い、残る立体化学を決定する予定である。




参考文献　1) Y. Obayashi *et al.*, WO Patent 97 44479, 1997.

total synthesis, anticancer, Ascochyta

講演番号：3C12p07
講演日時：3 月 19 日 15:40～ C 校舎 12 会場

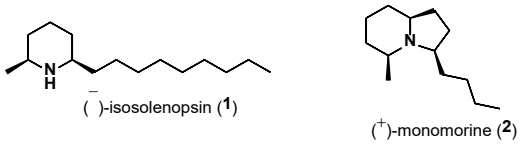
# 立体選択的なアミノパラデーションを用いた(−)-isosolenpsin と(+)-monomorine の合成研究

# Synthetic studies on (-)-isosolenopsin and (+)-monomorine using diastereoselective aminopalladation.

○武本 夕貴子[1]、服部 恭尚[2]、真壁 秀文[1] ([1]信大院農、[2]京都薬科大、共同利用機器センター)
○ yukiko TAKEMOTO[1], Yasunao HATTORI[2], hidefumi MAKABE[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Instrumental Analysis, Kyoto Pharmaceutical Unv.)

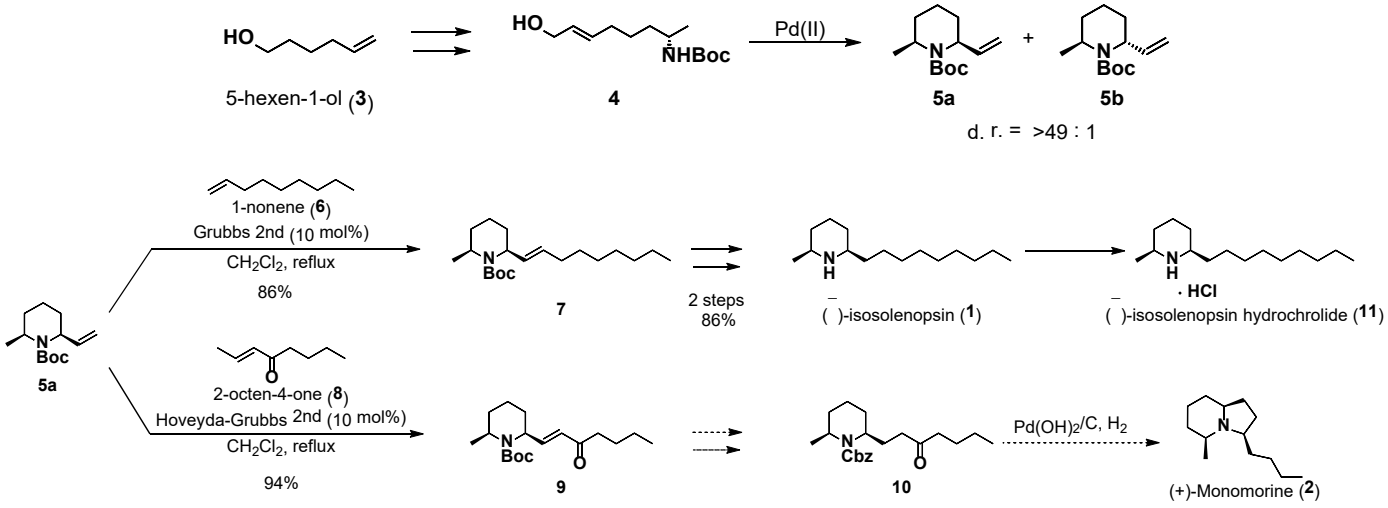
【目的】

アルカロイドは分子内に N 原子を含み、一般的に動物や植物が外敵から身を守り生き残るために生合成する天然物の総称である．ピペリジン環は天然の多様なアルカロイドの構造中に見られ、局所麻酔作用、抗腫瘍活性などの顕著な生理活性を示すことが知られている．本研究では、2 価パラジウム触媒を用いて C-N 結合形成時の C-6 位の立体化学を制御し、2,6-*cis*-ジアルキル置換型ピペリジン環を高ジアステレオ選択的に合成した。また、その生理活性解明のための試料供給を目的とし、(–)-isosolenopsin (**1**)および(+)-monomorine (**2**)の合成を行った。




【方法・結果】

**3**を出発物質として、Jacobsen 加水分解速度論的分割および光延反応を含む 10 段階の反応により、望む立体化学の環化前駆体 **4** を総収率 30%で合成した．続いて、2 価 Pd 触媒を用いた立体選択的な環化反応により 2,6-*cis*-ピペリジン環ユニット **5a** を構築した．さらに、1-nonene (**6**)と **5a** の交差メタセシスにより側鎖を伸長し、**1** の合成を完了した．現在、**2** の合成を行っている。




total synthesis, alkaloid

講演番号：3C12p08
講演日時：3 月 19 日 15:55～ C 校舎 12 会場

# アオウキクサ起源花芽誘導分子 LDS1 の合成と代謝物の探索

# Synthesis of flower-inducing compound LDS1 and its metabolic profile in Lemna paucicostata

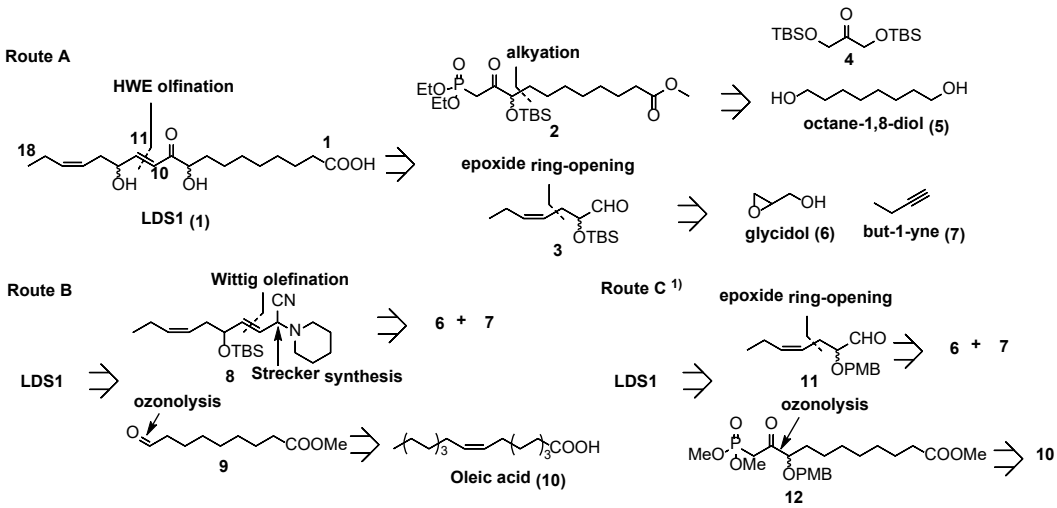
○山田 優作[1]、土屋 諒[2]、廣住 操俊[1]、竹本 裕之[3]、佐藤 浩平[1]、鳴海 哲夫[1]、戸田 三津夫[1]、大西 利幸[2,3]、間瀬 暢之[1,3]、渡辺 修治[4]([1]静大工、[2]静大農、[3]静大グリーン研、[4]静大創造科学技術大学院)

○Yusaku YAMADA[1], Ryo TSUCHIYA[2], Ayatoshi HIROZUMI[1], Hiroyuki TAKEMOTO[3], Kohei SATO[1], Tetsuo NARUMI[1], Mitsuo TODA[1], Toshiyuki OHNISHI[2,3], Nobuyuki MASE[1,3], Naoharu WATANABE[4] ([1]Faculty of Engineering, Shizuoka University, [2]Faculty of Agriculture, Shizuoka Univ ersity, [3]Research Institute of Green Science and Technology, [4]Graduate School of Scienc e and Technology, Shizuoka University)

【目的】

本研究室では、アオウキクサ（*Lemna paucicostata*）の乾燥処理によって生成する花芽誘導分子 (11*E*,15*Z*)-9,13-dihydroxy-10-oxooctadeca-11,15-dienoic acid（LDS1）の全合成、構造要求性を検討してきた。これまでに、LDS1 の 4 種のジアステレオマー間で花芽誘導活性に相違が無いことから 1）代謝変換後の花芽誘導の可能性、2）9–13 位の官能基の配列が活性発現に重要である可能性を見出してきた。今回は、下記の逆合成スキーム（Routes A, B, C）にしたがって LDS1 を合成し、および、アオウキクサに投与した際の代謝物の探索、分析を検討した。

【方法・結果】




**合成検討**：LDS1 は **4**、**5**、**6**、**7** を出発物質とした全 17 steps での合成を計画した。しかし、ホスホン酸エステル（**2**）の合成の際にケトンの α 位へのアルキル化が進行せず合成達成には至らなかった（Route A）。そこで、**8** と **9** との求核付加反応により LDS1 基本骨格の構築を目指した。ところが、**8** に塩基を作用させところ OTBS 基が脱離し、LDS1 合成には至らなかった（Route B）。そのため最近発表された LDS1 合成達成例[1)]を参考に、**6**、**7**、**10** を出発物質とした全 16 steps での合成を計画し、LDS1 の合成を達成した（Route C）。

**代謝物の探索**：*L. paucicostata* を数個体含む花芽誘導培地に 1 μM の LDS1 を減圧下投与後、花芽誘導を観察するまでの 10 日間、一定間隔で培養液と植物体をサンプリングした。それぞれを凍結乾燥し、低温下 MeOH で抽出/濾過後 LC-HRMS 分析に供した。本発表ではその詳細を報告する。

1) Takayasu, Y. *et al. Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2016**.

Metabolites, Synthesis, FlowerInducing Activity

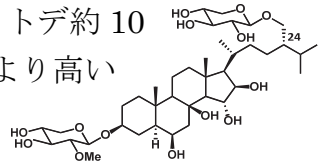
講演番号：3C12p09
講演日時：3 月 19 日 16:10～ C 校舎 12 会場

# オニヒトデステロイド配糖体の構造修飾と NGF 増強活性
# Modification of a steroid glycoside from *Acanthaster planci* and evaluation of NGF-enhancing activity

○岸 健太、原田 翔太、長島 志栞、小鹿 一（名大院・生命農）
○Kenta KISHI, Shota HARADA, Shiori NAGASHIMA, Makoto OJIKA (Nagoya Univ.)

【背景・目的】

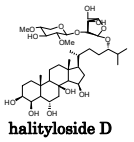
Acanthasteroside B3 は当研究室で沖縄産オニヒトデから単離された化合物で、神経モデル細胞である PC12 細胞に対して神経成長因子（NGF)増強活性を、加齢マウスに対して記憶改善効果を示す。よって AD などの神経変性疾患治療薬のリードとして期待されるが、オニヒトデ約 10 kg あたり 60 mg 程度と低含量である。そこで本研究では、オニヒトデからより高い収量で得られる他のステロイド配糖体を材料に用いて、大量供給可能かつ acanthasteroside B3 よりも活性の強い類縁化合物の開発を目指した。



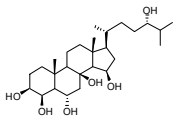
acanthasteroside B3

【方法・結果】

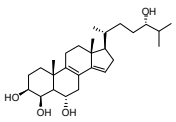
オニヒトデに含まれるステロイド配糖体を精査した結果、既知の halityloside D をオニヒトデ約 10 kg あたり 380 mg 以上得た。これは先に得られた acanthasteroside B3 の 6 倍以上の高い収量であった。NGF 増強活性検定の結果、halityloside D は acanthasteroside B3 に比べると弱いながらも NGF 増強活性を示した。よって halityloside D の活性の増強を目指して誘導化を行い、塩酸による酸加水分解により **1~3** を、アセチル化により **4~11** を、アセタール化により **12, 13** を得た。アグリコン **1** は天然物より高い NGF 増強活性を示したが、2 分子脱水体 **2** は強い細胞毒性を示し活性が確認できなかった。このことから、本研究においては活性の増強のみならず、毒性の低減も必要となった。**2** が毒性を示す一方、脱水体で糖を保持した **3** は活性を示したため、条件を満たした誘導体を得るには、分子全体の水酸基の数が重要であることが示唆された。アセテート **4~6** が活性を示し、**7~11** が毒性を示したことからもこの傾向は支持された。これに基づいて合成した 3,4 位アセトニド体 **12, 13** は、いずれも acanthasteroside B3 の約 2 倍、halityloside D の約 3 倍の活性を示し、活性の増強に成功したと言える。しかし **12, 13** は高濃度では毒性を示すので、今後は水酸基の数という観点だけでは無く、別の戦略にも基づいて更なる活性の増強と毒性の低減の両立を狙う。



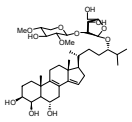
**halityloside D**



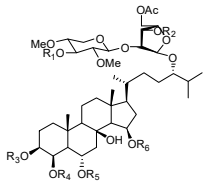
**1**



**2**

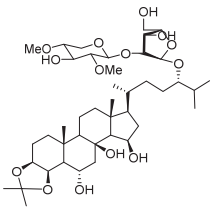


**3**

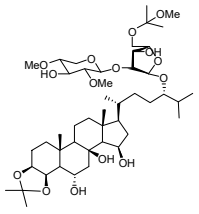


**4~11**

| | $R_1$ | $R_2$ | $R_3$ | $R_4$ | $R_5$ | $R_6$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 4 (1Ac) | H | H | H | H | H | H |
| 5 (2Ac) | Ac | H | H | H | H | H |
| 6 (3Ac) | Ac | Ac | H | H | H | H |
| 7 (4Ac) | Ac | Ac | Ac | H | H | H |
| 8 (4Ac) | Ac | Ac | H | H | Ac | H |
| 9 (5Ac) | Ac | Ac | Ac | H | Ac | H |
| 10 (6Ac) | Ac | Ac | Ac | Ac | Ac | H |
| 11 (7Ac) | Ac | Ac | Ac | Ac | Ac | Ac |



**12**



**13**

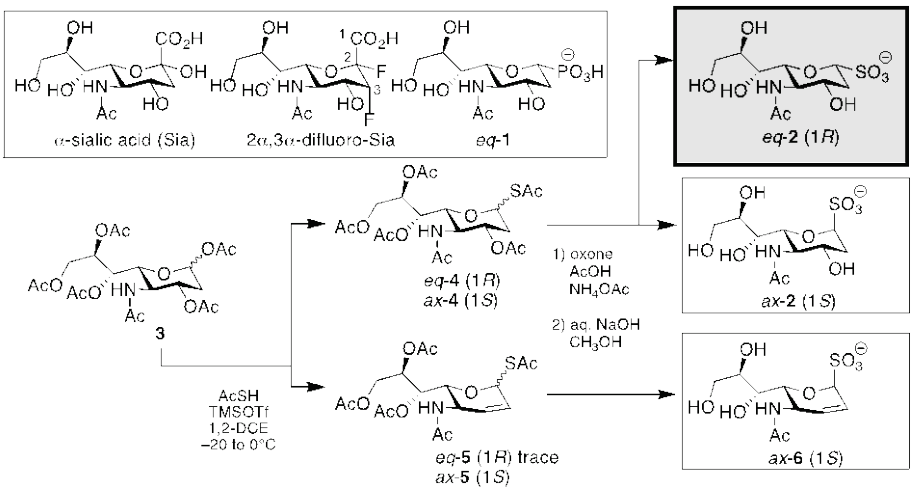
*Acanthaster planci*, neurite outgrowth, NGF-enhancing activity

講演番号：3C12p10
講演日時：3 月 19 日 16:25～ C 校舎 12 会場

スルホシアル酸：抗インフルエンザ薬の次世代開発戦略
Sulfo-sialic acids: next-generation strategy for the development of anti-influenza drugs
ヴァヴリカ クリストファー、武藤 千明、泉 実、○清田 洋正（岡山大院・環境生命）
Christopher Vavricka, Chiaki Muto, Minoru Izumi, ○Hiromasa Kiyota (Okayama Univ.)

インフルエンザシアリダーゼは、ウィルスが宿主細胞から放出される段階で働く。抗インフルエンザ薬として、拮抗阻害剤であるタミフルやリレンザなどが用いられてきた[1]。近年我々は、2α,3α-ジフルオロシアル酸がこの不可逆的阻害剤となることを、初めて明らかにした[2]。より強固な結合能を求めて、全てのシアリダーゼ活性中心にある三つのアルギニン残基と結合する、アノマー位カルボキシ基の代替を検討した。既に**ホスホノ体 (*eq*-1)** が有望との報告があり[3,4]、我々は更に電子吸引性の強い**スルホ体 (*eq*-2)** の作製を試みた[5]。

シアル酸誘導体 **3**[4] のアノマー位をSAc基で置換し*O,S*-アセタール **4** 及びそのグリカール **5** に導いた。各々 Oxone[6] で酸化してスルホン酸塩に導き、脱保護により**スルホシアル酸類**を得た[5]。




インフルエンザウィルス (H2N2)、ウェルシュ菌 (*Clostridium*)、連鎖球菌 (*Streptococcus*) のシアリダーゼ阻害活性試験を行った結果を表に示す。***eq*-2**はN2に対して***eq*-1**より40倍強力であり、***ax*-2**と***ax*-6**も強い活性を示した。***eq*-2**はウェルシュ菌と連鎖球菌にも効果があった。

**スルホ基**は、アノマー位官能基として最強の活性を示すことが分かった。**スルホシアル酸**を基盤とする次世代型不可逆的阻害剤の開発を進めている。

表　シアリダーゼ (NA) 阻害活性の$IC_{50}$値（μM）

| | *eq*-2 | *ax*-2 | *ax*-6 | *eq*-1 |
|---|---|---|---|---|
| influenza NA A/RI/5+/1957(H2N2) | 8.9 | 120 | 320 | 370 |
| *Clostridium perfringens* NanJ NA | 38 | >1000 | >1000 | 320 |
| *Streptococcus* 6646K NA | 3.7 | - | - | - |

改良蛍光検定法（4-メチルウンベリフェリル=α-D-シアロシド）[5,7]

1) M. von Itzstein (Ed.), Influenza virus sialidase - a drug discovery target. Springer Basel AG (2012). 2) C. J. Vavricka *et al.*, *Nat. Comm.* **4**, 1491 (2013). 3) K. Wallimann & A. Vasella, *Helv. Chim. Acta* **73**, 1359 (1990). 4) J. J. Shie *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 17959 (2011). 5) C. J. Vavricka & H. Kiyota, JP Pat. Appl. 162979 (2016). 6) A. Lipták *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **45**, 839 (2004). 7) M. Potier *et al.*, *Anal. Biochem.* **94**, 287 (1079).

influenza, sialidase inhibitors, sulfo-sialic acids

発表責任者：清田洋正（kiyota@okayama-u.ac.jp）

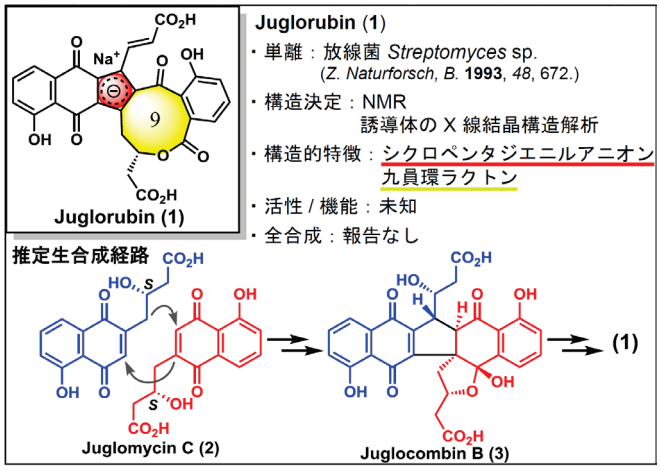
講演番号：3C12p11
講演日時：3 月 19 日 16:50～ C 校舎 12 会場

# シクロペンタジエニルアニオンを有する天然色素 Juglorubin の全合成

# Total Synthesis of Juglorubin, A Natural Dye Containing a Cyclopentadienyl Carbanion

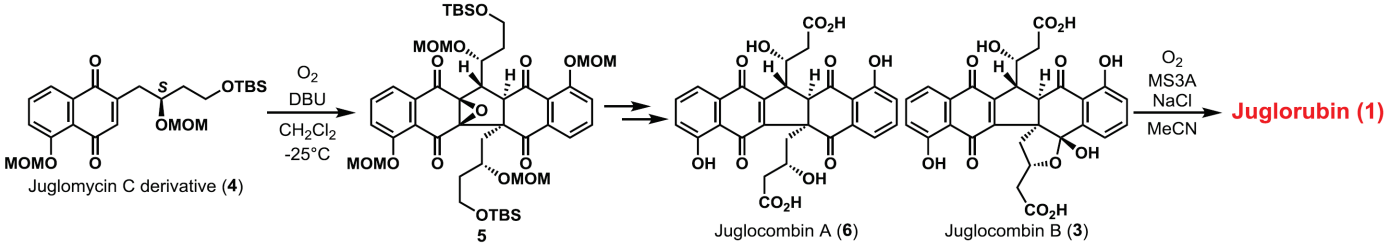
○加茂 翔伍[1,2,3]、吉岡 快[1]、倉持 幸司[1,2]、椿 一典[1]（[1]京府大院生命環境、[2]東理大理工、[3](独) 日本学術振興会特別研究員 DC）

○Shogo Kamo[1,2,3], Kai Yoshioka[1], Kouji Kuramochi[1,2], Kazunori Tsubaki[1]（[1]Kyoto Prefectural Univ., [2]Tokyo Univ. of Science, [3]JSPS Research Fellow）




［**背景**］Juglorubin (**1**) は 1993 年に放線菌より単離された赤色イオン性有機色素である[1]。その生合成は同じ菌より単離された天然物 Juglomycin C (**2**) とその二量体 Juglocombin B (**3**) を経由すると推定されている。Juglorubin はシクロペンタジエニルアニオンを有する天然物として最初に単離された化合物であり、同様の骨格を有する天然物はカバの汗の成分 Hipposudoric acid など数例が報告されているのみである[2]。このような特異な構造に由来し、Juglorubin が潜在的に有する生物活性や機能が期待される一方、単離報告から 20 年以上が経過した現在も活性・機能評価や合成研究などの関連研究は全くの未着手であった。そこで我々は生物活性測定や機能評価への応用展開を志向した Juglorubin の全合成法の確立を目指し研究に着手した。そして今回、種々検討を行った結果 Juglorubin の世界初の全合成を達成したので発表する。

［**方法・結果**］化合物 **3** から Juglorubin への変換は、酸化、C–C 結合開裂による九員環ラクトン形成反応、および脱水反応を経て進行すると考えられる。我々はまず、推定生合成経路に基づき開発した Juglomycin C 誘導体 **4** の二量化反応により、二量体 エポキシド **5** を立体選択的に得た[3]。その後、各種官能基変換により Juglocombin A (**3**) および B (**6**) を平衡混合物として得た[4]。ここで化合物 **3**/**6** から Juglorubin への変換について種々の条件で検討を行った結果、酸素雰囲気下、モレキュラーシーブ 3A と塩化ナトリウムを作用させる非常に単純な条件で反応が進行することを見出し、Juglorubin の世界初の全合成を達成した。現在、誘導体の合成や反応収率の向上を目指した検討を行っており、今後は生物活性測定や機能・物性評価へと研究を展開していく予定である。




1) Lessmann, H *et al. Z. Naturforsch, B.* **1993**, *48*, 672. 2) Saikawa, Y. *et al. Nature* **2004**, *429*, 363. 3) 加茂ら 日本農芸化学会 2015 年会 3E21p09.
4) Kamo, S. *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 10317. Highlighted in *Synfacts* **2016**, *12*, 1000.

Total Synthesis, Natural Product, Cyclopentadienyl anion

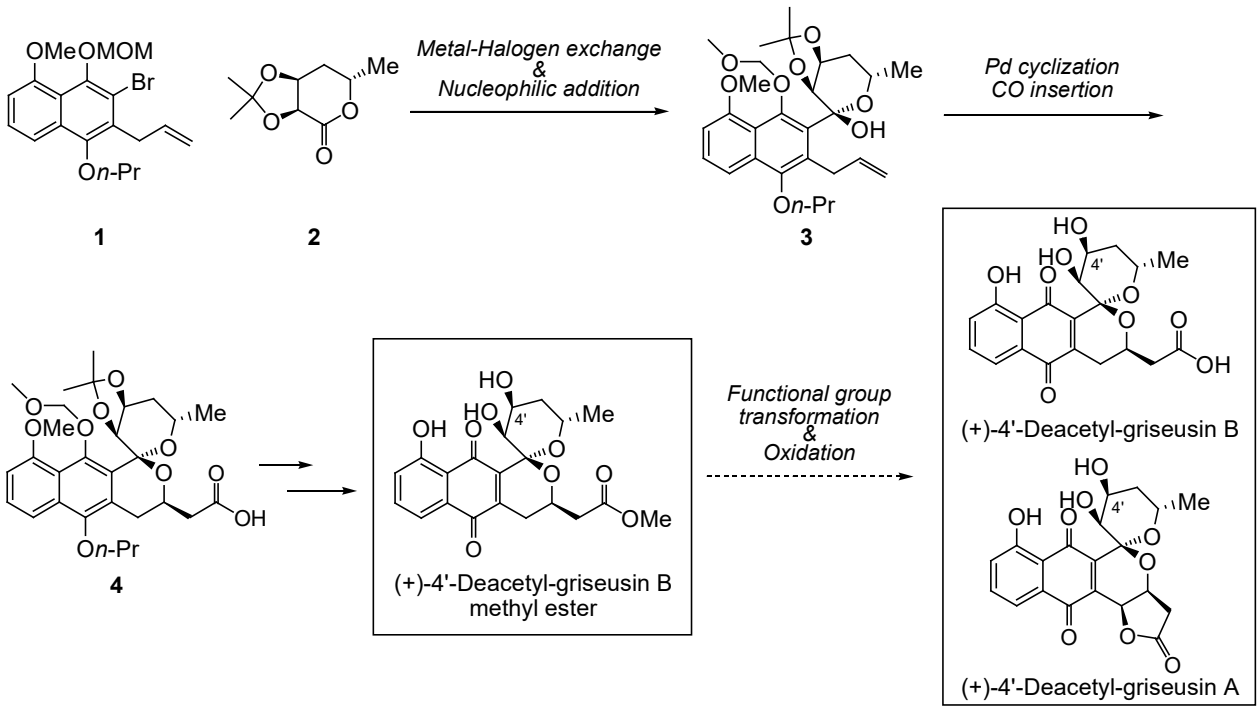
発表責任者：倉持幸司（kuramoch@rs.tus.ac.jp）

講演番号：3C12p12
講演日時：3 月 19 日 17:05～ C 校舎 12 会場

Griseusin 類の合成研究
Synthetic Study of Griseusins
○大倉 涼貴、佐古 尚裕、渡邉 秀典（東大院農・応生化）
○Atsuki OKURA, Takahiro SAKO, Hidenori WATANABE (Tokyo Univ.)

(+)-4’-Deacetyl-griseusin A, B, 及び B methyl ester は 2011 年に *Streptomyces sp.* IFM 11307 の培養液より単離、構造決定されたピラノナフトキノン化合物である [1)]。その生理活性として腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘導リガンド（TRAIL）に耐性を持ったヒト胃腺がん細胞に対して濃度依存的に細胞毒性、つまり TRAIL 耐性克服活性を有する。今回 Griseusin 類化合物の全合成を達成したので報告する。

ブロモ体 **1** とラクトン **2** を金属ハロゲン交換経由のカップリング反応を行うことでヘミケタール **3** を合成した。ヘミケタール **3** に対して 2 価パラジウムを用いた環化、続く一酸化炭素挿入反応によってカルボン酸 **4** を合成した。これに対して保護基の脱保護、官能基変換を行うことで(+)-4’-Deacetyl-griseusin B methyl ester の全合成を達成した。現在は他の Griseusin 類として(+)-4’-Deacetyl-griseusin A, B の合成を検討している。




1) M. S. Abdelfattah, T, Kazufumi, M. Ishibashi, *J. Antibiotics*, **2011**, *64*, 729-734

Total Synthesis, Griseusin

講演番号：3C12p13
講演日時：3 月 19 日 17:20～ C 校舎 12 会場

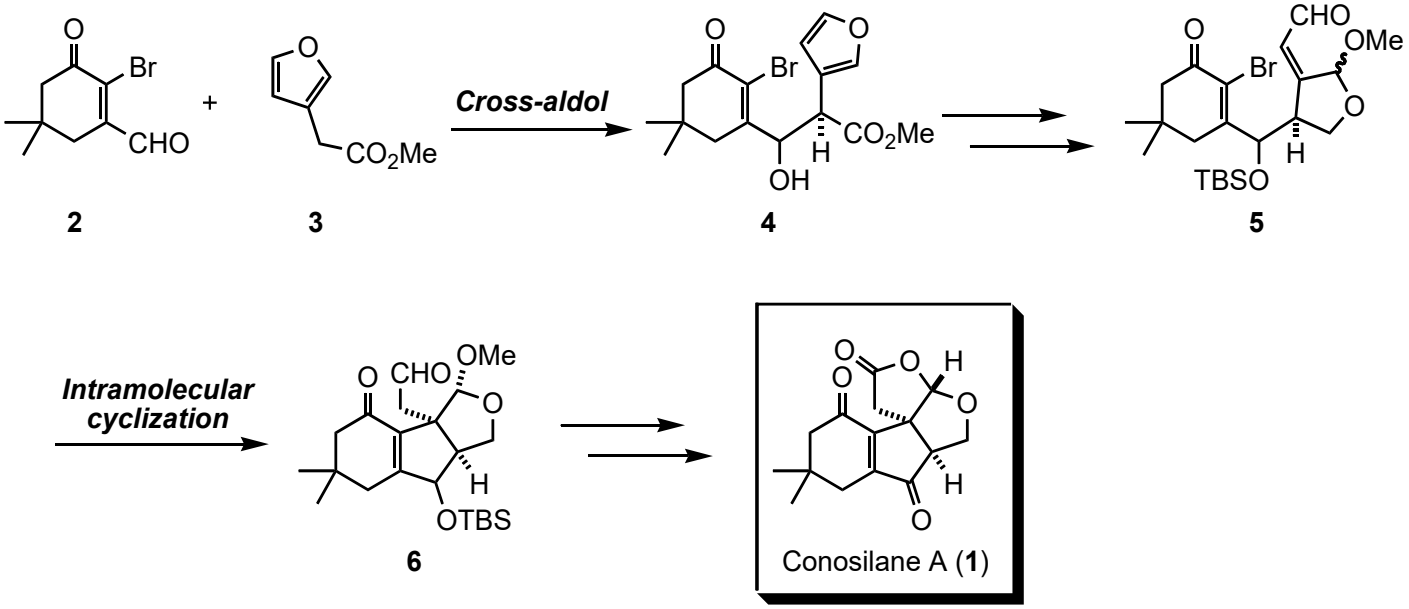
# Conosilane A の合成研究

# Synthetic study of Conosilane A

○岡村 仁則、渡邉 秀典（東大院農生科・応生化）
○Hironori OKAMURA, Hidenori WATANABE (The University of Tokyo)

Conosilane A (**1**) は、オキナタケ科のキノコの一種である *Conocybe siliginea* の培養液より 2012 年に単離されたセスキテルペンである [1]。本化合物は 11β-HSD1 という、生活習慣病型疾患の関連因子であると示唆されている酵素に対し中程度の阻害活性を有している。今回、本化合物の初のラセミ体全合成を達成したので報告する。

ジメドンを出発原料に合成した不飽和アルデヒド **2** と既知のエステル **3**[2]とのクロスアルドール反応によりβ-ヒドロキシエステル **4** を得た後に、フラン環の酸化と続くアセタール交換により環化前駆体である不飽和アルデヒド **5** へと導いた。**5** に対し鍵反応である分子内環化反応を検討したところ、ビス(1,5-シクロオクタジエン)ニッケル(0)を用いた Heck 型の環化条件下で、最も収率良く環化体 **6** を得ることが出来た。得られた環化体から 3 工程で Conosilane A の初のラセミ体全合成を達成した。現在、本化合物の絶対立体配置の決定を目的に、不斉全合成に着手している。




**2** **3** **4** **5** **6**

1) Xiao-Yan Yang, Tao Feng, Zheng-Hui Li, Yu Sheng, Xia Yin, Ying Leng, Ji-Kai Liu, *Org. Lett.*, **2012**, *14*, 5382.
2) C. Villarreal, R. Martinez, *Synthesis*, **2010**, *19*, 3346.

total synthesis, sesquiterpene, 11ß-HSD1

講演番号：3C12p14
講演日時：3 月 19 日 17:35～ C 校舎 12 会場

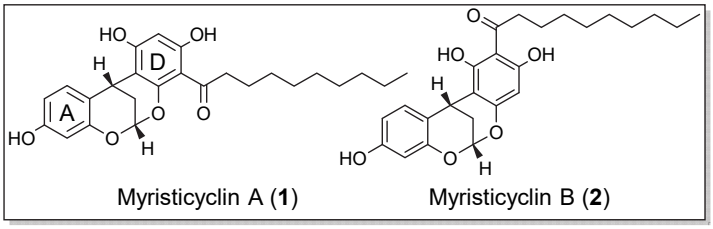
# 抗マラリア活性を有する Myristicyclin 類の不斉合成研究

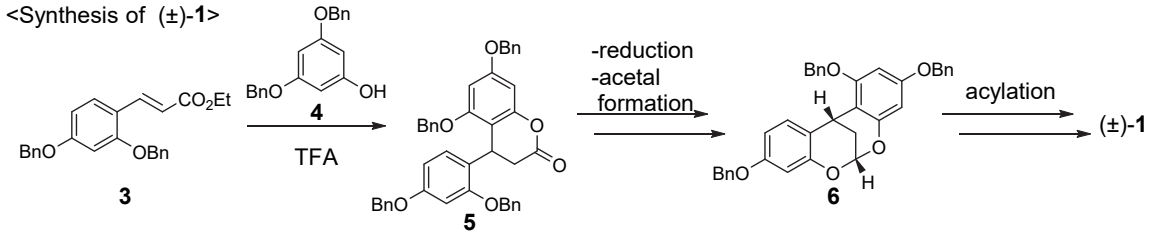
# Study toward the asymmetric synthesis of Myristicyclins

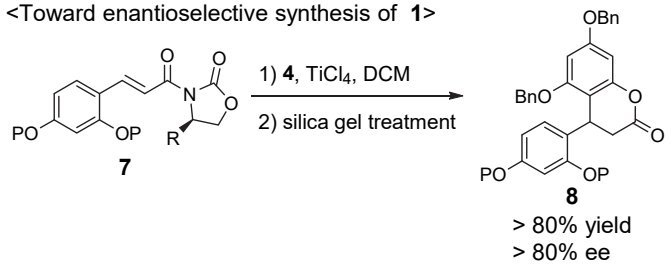
○久保 伸一郎、渡邉 秀典（東大院農生科）
○Shinichiro Kubo, Hidenori Watanabe (The Univ. of Tokyo)

Myristicyclin A（**1**）及び B（**2**）は *Horsfieldia spicata* より単離された化合物であり、抗マラリア活性を有することが Ireland[1)]らにより報告されている。今回 **1** の不斉合成に向けた検討をここに報告する。

2016 年の本大会にて、不飽和エステル（**3**）から得られるラクトン（**5**）を経た **1** のラセミ体合成を報告した。**1** の不斉合成に向けて、ルイス酸存在下、光学活性なオキサゾリジノン補助基を用いた不斉誘導を検討した。**7** の保護基(P)として Bn を用いた場合には目的とする反応の進行とともに基質の分解が認められた。そこで電子吸引性を有する Ts 基を用いたところ、副反応を抑制するとともに目的とするラクトン(**8**)を得ることが出来た。不斉オキサゾリジノン補助基の置換基(R)としては Ph 基が適しており、最適化された条件にて>80%収率、>80% ee を達成した。




1) Chris M. Ireland et al., *Org. Lett.* **2014**, *16*, 346

Myristicyclins, synthesis

講演番号：3C12p15
講演日時：3 月 19 日 17:50～ C 校舎 12 会場

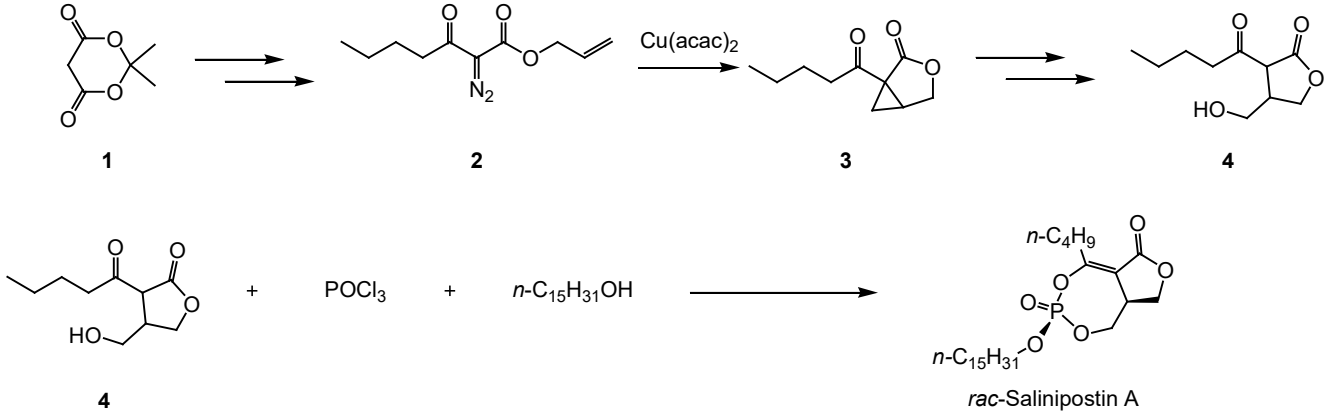
# Salinipostin A の合成研究

# Synthetic Study Of Salinipostin A

○藤岡 孝亘、渡邉 秀典（東大院農）
○Takanobu FUJIOKA, Hidenori WATANABE (The Univ. of Tokyo)

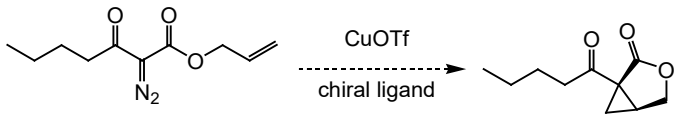
Salinipostin A は海洋放線菌である *Salinispola* sp. から単離・構造決定された [1)]、5 員環ラクトンと 7 員環の縮環構造を持つ、含リン化合物である。生理活性として、マラリア原虫である *Plasmodium falciparum* に対する細胞毒性、すなわち抗マラリア活性を有する。今回、本化合物のラセミ合成を達成したので報告する。

メルドラム酸 **1** に対して 2 工程の変換を行うことでジアゾ化合物 **2** を合成した。これに対して Cu（Ⅱ）を触媒に用いることで金属カルベン錯体を形成させ、分子内シクロプロパン化反応を行うことで 5 員環ラクトンと 3 員環の縮環構造を持つ化合物 **3** を合成した。これに対して数工程の変換を行うことで化合物 **4** を経由し、Salinipostin A のラセミ全合成を達成した。現在は **2** から **3** のシクロプロパン化反応に不斉配位子を用いることで Salinipostin A の不斉合成をすべく検討している。




**1** **2** **3** **4** **4** *rac*-Salinipostin A

---




**2** **3'**

1）Christopher J. Schulze *et al.*, *J. Org. Chem.*, **2015**, *80*, 1312-1320

total synthesis, cyclopropanation, carbene

講演番号：3C12p16
講演日時：3 月 19 日 18:05～ C 校舎 12 会場

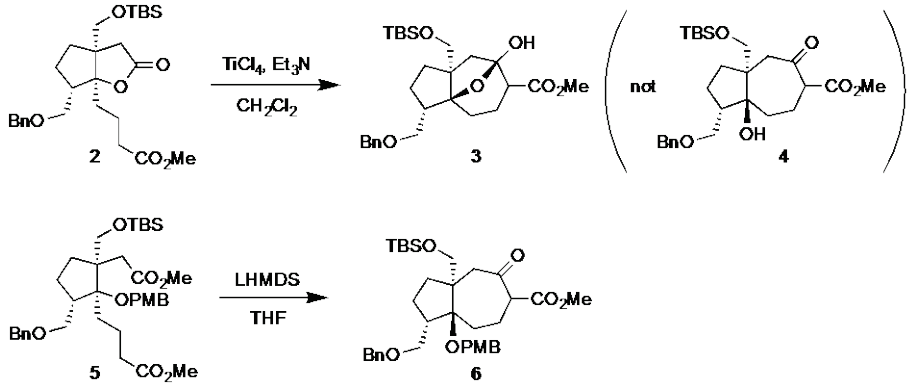
Dieckmann 縮合を用いた pseudolaric acid B の合成研究
Synthetic study of pseudolaric acid B employing Dieckmann condensation
○森 直紀、間瀬 千晶、赤松 禎久、渡邉 秀典 (東大院農生科・応生化)
○Naoki MORI, Chiaki MASE, Yoshihisa AKAMATSU, Hidenori WATANABE (The Univ. of Tokyo)

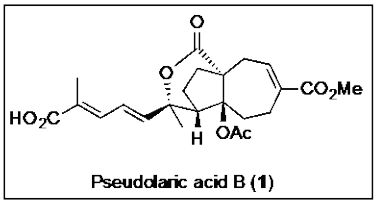
【目的】

Pseudolaric acid B (**1**)はイヌカラマツ *Pseudolarix kaempferi* Gordon (pinaceae)の根皮から単離されたジテルペン酸であり、強力な抗菌・抗腫瘍活性を示すことが知られている。**1** は構造的特徴として、天然には珍しい 5 員環と 7 員環のトランス縮環構造, さらにはラクトン部を含むコンパクトな 3 環性構造をしており, 有機合成化学的に大変興味深い。これまでに数多くの合成研究がなされてきたが、全合成の報告は 2007 年の Trost らによる一例にとどまっていたため、我々は新たなアプローチによる **1** の合成を目指すこととした。

【方法と結果】

**1** の合成における最重要課題は 5 員環と 7 員環のトランス縮環構造の構築であり、我々は Dieckmann 縮合を鍵反応としてその構造を構築しようと考えた。まず始めに、**2** に対して Dieckmann 縮合を検討したところ、$TiCl_4$ を用いる条件において反応が進行することを見出した。ところが得られた生成物は **4** ではなくヘミアセタールを形成した **3** であることがわかった。そこで問題となった 3 級水酸基を先に保護しておくこととした。**2** より数工程の変換で調製した **5** に対して Dieckmann 縮合を試みたところ、今度は LHMDS を用いた場合に環化反応が進行し、目的物である **6** を得ることに成功した。




Pseudolaric acid B, diterpene, Dieckmann condensation

講演番号：3C13a01
講演日時：3 月 19 日 09:20～ C 校舎 13 会場

# 薬剤感受性出芽酵母を用いたミトコンドリアを標的とする 新規農薬リード化合物 decatamariic acid の取得

# Decatamariic acid, a new mitochondrial respiration inhibitor discovered by pesticidal screening using drug-sensitive Saccharomyces cerevisiae

○渡邊 善洋[1]、須賀 拓弥[1]、成沢 里美[2]、横川 怜美[2]、岩月 正人[1,3]、野中 健一[1,3]、中島 琢自[1,3]、篠原 康雄[4]、塩月 孝博[5]、一丸 直哉[6]、三芳 秀人[7]、浅見 行弘[1,3]、大村 智[3]、塩見 和朗[1,3] ([1]北里大感染制御、[2]北里大理、[3]北里大生命研、[4]徳島大薬院、[5]農生資研、[6]京都学園大バイオ環境、[7]京大農院)

○Yoshihiro WATANABE[1], Takuya SUGA[1], Satomi NARUSAWA[2], Satomi YOKOKAWA[2], Masato IWATSUKI[1,3], Kenichi NONAKA[1,3], Takuji NAKASAHIMA[1,3], Yasuo SHINOHARA[4], Takahiro SHIOTSUKI[5], Naoya ICHIMARU[6], Hideto MIYOSHI[7], Yukihiro ASAMI[1,3], Satoshi OOMURA[3], Kazurou SHIOMI[1,3] ([1]Graduate School of Infection Control Sciences, Kitasato Univ., [2]School of Science, Kitasato Univ., [3]Kitasato Institue for Life Science, [4]Faculty of Pharmaceutical Seiences, [5]NIAS, [6]Faculty of Bioenviromental Science, Kyoto Gakuen Univ., [7]Graduate Shool of Agriculture, Kyouto Univ.)

【背景と目的】

ATP はミトコンドリアのエネルギー変換膜において産生され、生命維持に必須の生物共通のエネルギー源である。そのため、選択毒性の問題からミトコンドリアをターゲットとする殺虫剤の実用化は難しいと考えられてきた。しかし、近年ミトコンドリア電子伝達系複合体 I を阻害する fenpyroximate, pyrimidifen 等といった高性能の殺ダニ剤に続き、複合体 III をターゲットとするキノコより単離・構造決定された strobilurin A 類縁の抗真菌剤も上市され、安全性の面からも十分に実用化できることが証明されつつある。また、複合体 I を作用部位とする殺ダニ剤は、ダニ以外の害虫にも有効であることから、化学構造次第では新たな活性や特性を付与した殺病害虫剤のシード化合物の創出が期待できると考えられ、ミトコンドリアの ATP 産生に作用点を狙った研究がなされている。そこで本研究では、殺虫剤のターゲットをミトコンドリアとした。またスクリーニングには薬剤感受性出芽酵母を用いた。酵母は高等真核生物のモデルとして様々なスクリーニングで使用されてきた。しかし、薬剤耐性が高いことがスクリーニングにおける問題点とされていた。本実験では薬剤排出に関わる 4 つの遺伝子を欠損した出芽酵母を使用することで新規ミトコンドリア阻害剤の取得を試みた。このような背景のもと、殺虫剤開発の出発点であるリード化合物となりうる天然物を微生物二次代謝産物から単離・精製および構造解析して、その天然物の生物活性を評価することを目的とした。

【方法】

薬剤排出に関わる4つの遺伝子を欠損した薬剤感受性出芽酵母を用いた。この出芽酵母を含グルコース培地、含グリセロール培地の二種類の培地で培養し、含グリセロール培地での出芽酵母の生育を選択的に阻害する微生物培養液サンプルをペーパーディスク法により選抜し、活性物質の精製を行った。

【結果と考察】

放線菌培養物および糸状菌培養物合計 9,009 検体よりスクリーニングを行い、糸状菌 FKI-6817 培養物を選抜した。糸状菌 FKI-6817 株を培養後、各種クロマトグラフィーにより活性物質として新規物質 decatamariic acid を 9.1 mg 単離した。その後、各種 NMR による構造解析から新規化学構造を有する活性物質であると決定し、さらに計算化学より絶対立体配置も決定した。decatamariic acid は、含グリセロール培地上で選択的に薬剤高感受性出芽酵母の生育阻害を示した。さらに、単離ミトコンドリアを用いたアッセイにおいて ATP 排出抑制を示した。以上の結果から、decatamariic acid はミトコンドリアの ATP の排出を抑制することで ATP の供給を阻害し、含グリセロール培地上で選択的に薬剤高感受性出芽酵母の生育阻害を示していると考えられる。

decalin, mitochondrial inhibitor, pesticide

講演番号：3C13a02
講演日時：3 月 19 日 09:35～ C 校舎 13 会場

# 微生物代謝産物からの抗マラリア活性物質の探索

# Search of anti-malarial seeds from microbial metabolites

○深澤 航[1]、岩月 正人[1,2]、野中 健一[1,2]、松本 厚子[1,2]、石山 亜紀[1,2]、穂苅 玲[2]、乙黒 一彦[2]、大村 智[2]、塩見 和朗[1,2] ([1]北里大感染制御、[2]北里大生命研)
○Wataru FUKASAWA[1], Masato IWATSUKI[1,2], Kenichi NONAKA[1,2], Atsuko MATSUMOTO[1,2], Aki ISHIYAMA[1,2], Rei HOKARI[2], Kazuhiko OTOGURO[2], Satoshi ŌMURA[2], Kazurou SHIOMI[1,2] ([1]Grad. Sch. Infect. Control., [2]Kitasato Inst. Life. Sci.)

**【背景と目的】**マラリアはマラリア原虫によって引き起こされる原虫感染症で、ハマダラカを媒介にして感染域を拡大する。既存薬としてアルテミシニン等が用いられているが、耐性原虫が出現していることから新たな作用機序を持つ抗マラリア剤の開発が求められている。そこで演者はマラリア原虫およびマラリア原虫解毒酵素 glyoxalase Ⅰ（以下 *Pf*GloI）を標的とし、微生物代謝産物から新たな抗マラリア剤のシード化合物を探索した。

**【方法】**抗マラリア原虫活性物質のスクリーニング

本スクリーニングは熱帯熱マラリアの多剤耐性 K1 株およびヒト正常線維芽細胞 MRC-5 を用いて行った [1)]。1 次スクリーニングで抗マラリア活性を示したサンプルについて 2 次スクリーニングで MRC-5 に対する細胞毒性を調べて、選択性を有するサンプルを選択した。

*Pf*GloI 阻害物質のスクリーニング

本スクリーニングで用いた酵素は *Pf*GloI 組み換え大腸菌を用いて調製し、活性評価は文献 [2)] に従って実施した。サンプルの *Pf*GloI 阻害活性は酵素反応の進行に伴って増加する D-lactoylglutathione 由来の 240 nm における吸収を測定することで算出した。一次スクリーニングでは 5 μl で *Pf*GloI を 70%以上阻害するサンプルを選択した。二次スクリーニングでは 1 μl でも *Pf*GloI を 50%以上阻害するサンプルを選択した。

**【結果と考察】**抗マラリア原虫活性物質のスクリーニング

3,004 サンプルについてスクリーニングした結果、糸状菌 *Microdiplodia* 属 FKI-7019 に強い抗マラリア活性を見出した。この再培養液から活性物質として推定分子量 1,060 の環状ペプチドを単離した。

*Pf*GloI 阻害活性物質のスクリーニング

5,412 サンプル中より糸状菌 *Beauveria* 属 FKI-7429 に *Pf*GloI 阻害活性を見出した。この再培養液を用いて精製を行った。

(参考文献)

1) Otoguro, K. *et al*. Potent antimalarial activities of polyether antibiotic, X-206. *J. Antibiot. 54*, 658–663 (2001).

2) Ishiyama, A. *et al*. Antimalarial tropones and their *Plasmodium falciparum* glyoxalaseI (*Pf*GloI) inhibitory activity, *J. Antibiot. 67*, 545–547 (2014).

malaria, microbial metabolite, fungi

発表責任者：深澤　航（mi16010@st.kitasato-u.ac.jp）

講演番号：3C13a03
講演日時：3 月 19 日 09:50～ C 校舎 13 会場

# 糸状菌 *Pochonia* sp. FKI-7537 株培養液抽出物から得られた新規化合物 pochoniolide A および B について

# Two new muconolactone compounds, pochoniolide A and B, isolated from *Pochonia* sp. FKI-7537

○宮野 怜[1]、松尾 洋孝[2]、野中 健一[2]、庭野 吉己[3]、塩見 和朗[2]、高橋 洋子[2]、大村 智[2]、中島 琢自[2] ([1]北里大院・感染制御、[2]北里大・生命研、[3]東北大院・歯)

○Rei MIYANO[1], Hirotaka MATSUO[2], Kenichi NONAKA[2], Yoshimi NIWANO[3], Kazuro SHIOMI[2], Yoko TAKAHASHI[2], Satoshi OMURA[2], Takuji NAKASHIMA[2] ([1]Graduate School of Infection Control Sciences, Kitasato Univ., [2]Kitasato Institute for Life Science, Kitasato Univ., [3]Graduate School of Dentistry, Tohoku Univ.)

【背景と目的】微生物の二次代謝産物から、生物活性を指標に多くの化合物が取得されてきた。しかし、特定の生物活性評価系を用いて二次代謝産物から有用化合物を探索することは、かなりの偶然性を期待しており、既知化合物に遭遇することも多い。また、目的の生物活性の評価系に適さなかった化合物は、新規化合物であったとしても見逃されてきたと考えられる。

近年の画期的な分析機器の発展は、多くの化合物の検出を可能にし、微生物の化合物生産能を最大限に引き出すことができるようになった。当研究室では微生物培養液抽出物に含まれる化合物の物理化学的性状に着目した physicochemical screening（PC screening）を積極的に進めてきた。すなわち、化合物の HPLC 保持時間 (RT)、UV スペクトル、分子量などの物理化学的性状をデータベースと比較し、新規性を予測して単離精製を進める方法である。これまで、当研究室では放線菌培養液抽出物から PC screening により mangromicin 類[1] や iminimycin 類[2, 3] 等の新規化合物を取得してきた。

本研究は、北里生命科学研究所が保有する糸状菌を新規化合物探索源として活用するため、これらの菌株を PC screening の対象とし、新規化合物を取得することを目的とした。

【方法と結果】長期保存糸状菌 30 株を 2 種類の生産培地で培養して得られた培養液抽出物 60 サンプルの LC/UV-MS データ解析より、*Pochonia* sp. FKI-7537 株が生産する 2 つの化合物 (それぞれ FKI-7537A, B と仮称) を選択した。

FKI-7537A 物質は RT 26.3 min, *m/z* 319.0461, $\lambda_{max}$ = 228, 274 nm に UV 極大吸収を持つ化合物で FKI-7537B 物質は RT 26.7 min, *m/z* 335.0412, $\lambda_{max}$ = 224, 276, 310, 368 nm に UV 極大吸収を有する化合物であった。これらの化合物の物理化学的性状をデータベースにて検索した結果、該当するものはなく新規化合物と推定した。

FKI-7537 株を生産培地 6 L で培養後、培養液を液々分配および各種クロマトグラフィーに供し、FKI-7537A 物質を 10 mg, 7537B 物質を 46 mg 取得した。各種分析機器を用いて構造解析を行った結果、FKI-7537A, B は muconolactone 構造を有する新規化合物であり、それぞれ pochoniolide A, B と命名した。比旋光度の結果より、 pochoniolide A, B はラセミ体で存在していることが示唆された。

抗酸化活性試験の結果、pochoniolide B は弱いスーパーオキシドアニオン消去活性を示した。

【参考文献】

1) Nakashima T. *et al*., *J. Antibiot*., **67**, 253-260 (2014)
2) Nakashima T., Miyano R. *et al*., *J. Antibiot*., **69**, 611-615 (2016)
3) Nakashima T., Miyano R. *et al*., *Tetrahedron Lett*., **57**, 3284-3286 (2016)

physicochemical screening, fungi, muconolactone

講演番号：3C13a04
講演日時：3 月 19 日 10:05～ C 校舎 13 会場

# 糸状菌を探索源とした physicochemical screening による新規物質の探索

# The search for new compound from secondary metabolites of fungi using physicochemical screening

○松尾 洋孝、野中 健一、高橋 洋子、大村 智、中島 琢自（北里大・生命研）
○ Hirotaka MATSUO, Kenichi NONAKA, Yoko TAKAHASHI, Satoshi OMURA, Takuji NAKASHIMA (Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato Univ.)

【背景・目的】

微生物はこれまでに、人知の及ばない構造を有する化合物を提供してきた。化学構造の多様性は、生物活性の多様性と深く関わっており、創薬業界でも新規化合物の取得が強く望まれている。特に、糸状菌からは医薬品、農薬、生化学試薬といった様々な有用物質が取得されてきており、今日においても有用物質の探索源として広く用いられている。一般的に、これまでに見出されてきた生物活性物質の多くは、ある特定の活性を指標に探索されてきたため、目的の活性と偶然に一致した化合物が存在していた場合のみ、化合物が取得されてきた。しかしながら、この方法では既知化合物に遭遇することが多い。

生物活性を指標にした有用物質探索は、目的にあった物質を得る手段として確かに理にかなっている。しかし、目的以外の物質は有用なものであったとしても見逃されている可能性が高いと考えられる。近年の画期的な分析機器の発展は、多くの化合物を検出することができるため、微生物の化合物生産能を最大限に引き出すことを可能にした。当研究室では、化合物の物理化学的性状 (分子量、分子式、UV スペクトル、極性など) を指標とした “Physicochemical (PC) screening” によりユニークな骨格を有する新規化合物を取得してきた (Nakashima T. *Biochem. Pharmacol.*, 2016 *in press*)。今回、PC screening により新たに糸状菌の二次代謝産物から新規化合物を取得したので報告する。

【方法・結果】

糸状菌新鮮分離株 940 株が 4 種類の培地で培養された計 3,760 サンプルの中から、培養液の色調が特徴的なサンプルを選定し、HPLC/PDA で分析した。その結果、*Fusarium* sp. FKI-7792 株が米培地で培養されたときの抽出物に特徴的な UV スペクトル ($\lambda_{max}$ = 266, 290, 305, 318, 353, 368 nm) を示す化合物を見出した (FKI-7792A と仮称)。LC/HRESIMS により、FKI-7792A は *m/z* 399.0842 $[M-H]^-$ に疑分子イオンピークが観測され、その同位体ピークから構造内に塩素原子を有することが示唆された。これらの物理化学的性状を Dictionary of Natural Products、および SciFinder で検索した結果、該当する既知化合物がなかったため、新規化合物であると推定した。そこで、FKI-7792 株を米培地 2 kg で培養後、各種クロマトグラフィーにより精製し、5.2 mg 取得した。各種 NMR 解析の結果、isocoumarine 類の新規化合物であることが明らかとなった。

Physicochemical screening, fungi

講演番号：3C13a05
講演日時：3 月 19 日 10:20～ C 校舎 13 会場

深海由来糸状菌培養物からの抗ミズカビ化合物の探索
Search for anti-saprolegniasis compounds from deep-sea fungal metabolites
○高橋 こなみ[1,2,3]、酒井 一成[2]、長野 由梨子[3]、大類 穂子[3]、Lima Andre O.[4]、Pellizari Vivian H.[5]、岩月 正人[2,6]、瀧下 清貴[3]、野中 健一[2,6]、藤倉 克則[3]、大村 智[2]（[1]東京海洋大院、[2]北里大生命研、[3]海洋研究開発機構、[4]Vale do Itajai Univ.、[5]Sao Paulo Univ.、[6]北里大院感染制御）
○Konami Takahashi[1,2,3], Kazunari Sakai[2], Yuriko Nagano[3], Sakiko Orui[3], Andre O. Lima[4], Vivian H. Pellizari[5], Masato Iwatsuki[2,6], Kiyotaka Takishita[3], Kenichi Nonaka[2,6], Katsunori Fujikura[3], Satoshi Omura[2] ([1]Grad. Sch. of Mar. Sci. and Tech., TUMSAT, [2]Kitasato Inst. Life. Sci., Kitasato Univ., [3]JAMSTEC, [4]Vale do Itajai Univ., [5]Sao Paulo Univ., [6]Grad. Sch. Infect. Control. Sci., Kitasato Univ.)

*Saprolegnia* 属に代表されるミズカビ類は、病原性の卵菌類で、一部はサケの卵等に感染することで、サケのふ化場で深刻な被害をもたらしている。近年まで、抗ミズカビ剤としてマラカイトグリーンが使用されていたが、発ガン性が認められたため、現在では食用魚に対して使用禁止となっている。代替薬剤として用いられているブロノポールは、水棲生物への強い毒性や、使用済み薬剤の廃棄コストの高さなどの問題を抱えており、環境に優しい新たな抗ミズカビ剤の開発が求められている。

これまでに医薬、農薬等の開発には天然物が大きな役割を果たしており、その中でも糸状菌培養物は、新規薬剤の探索源として現在最も活用されている資源のひとつである。しかしながら、これまでの薬剤の探索は陸上由来糸状菌培養物において集中的に行われてきたが、長年にわたる探索により、新規物質の発見効率が低下傾向にある。したがって、新たな糸状菌の分離環境として海洋環境に注目が集まっている。実際に、浅海の糸状菌培養物からは陸上由来のものとは異なる構造を持つ新規化合物が次々と報告されている。さらに、技術の進歩により、これまでアクセスが困難であった深海に多様な糸状菌が生息していることが明らかとなってきており、新規化合物生産能に対しても期待が高まっている。そこで本研究では深海由来糸状菌の培養物から抗ミズカビ活性物質の探索を行った。

JAMSTEC YK13-04 航海（Quelle 2013）にて、ブラジル沖水深約 1200-4200m の深海環境から採集した試料より分離培養された糸状菌 91 株を 6 種類の生産培地にて培養を行った（546 サンプル）。その培養物を用いて卵菌 2 種（*Saprolegnia parasitica* および *Pythium* sp.）、真菌 2 種および細菌 2 種に対しペーパーディスク法による抗菌試験を行った。その結果、546 サンプル中 20 サンプルにおいて、*S. parasitica* のみ、または 2 種の卵菌に対して選択的な抗菌活性が確認された。そのうち、2 種の卵菌に対して強い抗菌活性を示した *Penicillium coralligerum* YK-247 株の培養物から抗菌活性物質を単離精製した。その結果、cladosporin 新規類縁体(**1**)[1]を単離構造決定した。加えて、既知化合物 cladosporin(**2**)および 5'-hydroxyasperentin(**3**)を単離・構造同定した。これら化合物を用いて上記の卵菌 2 種および他の 4 種に対する抗菌試験を行ったところ、化合物 **3** はいずれの菌に対しても活性を示さなかった。化合物 **1** および化合物 **2** は、*S. parasitica* に対して 10 μg/disc で、それぞれ 23 mm、13 mm、*Pythium* sp.に対して 26 mm, 12 mm の阻止円径を示した。しかしながら、他の 4 種の菌に対して抗菌活性を示さなかった。以上の結果から、本化合物は抗ミズカビ剤のリード化合物として期待される。1) Takahashi, K. *et al.*, *J. Antibiot.* (2016) in preparation.

Deep-sea fungi, Cladosporin, *Saprolegnia parasitica*

発表責任者：野中健一（ken@lisci.kitasato-u.ac.jp）

講演番号：3C13a06
講演日時：3 月 19 日 10:45～ C 校舎 13 会場

放線菌の生産するアクチノロージン類縁化合物
Actinorhodin family antibiotics from *Streptomyces* sp.
○菰田 俊一、丸山 繭（宮城大　食産業）
○Toshikazu Komoda, Mayu Maruyama (Miyagi Univ.)

[目的]
　放線菌は、様々な二次代謝物を生産することが知られており、従来から生理活性物質の探索源として利用されてきた。本研究では、枯草菌に対する抗菌活性を指標にしながら、放線菌の代謝産物中に新たな機能性成分を見出し、その化学構造を明らかにすること、また、見出した成分の持つ生理機能を明らかにすることを目的をした。

[方法および結果、考察]
　はじめに、仙台市内を中心として各地より土壌から放線菌を単離し、ここから活性菌を選抜することとした。採取した土壌サンプルを、平板培地に塗布し、約 1 週間程度の静置培養を行った。培養後、平板培地上に生育した放線菌を斜面培地に移植し、検索対象の放線菌とした。単離された放線菌は試験管による培養を行い、その培養ろ液の抗菌性をペーパーディスク法により評価した。約 200 の放線菌をいくつかの培地にて培養した結果、16T088 株の培養ろ液に枯草菌に対する抗菌作用があることがわかった。そこで、このこの放線菌 16T088 株を、次の大量培養に供することとした。グルコース、酵母エキス、麦芽エキスを含む培地中で、回転培養により、7 日間の培養を行った後、ろ液(9.6L)を酢酸エチルにより抽出した。続いて、この酢酸エチル抽出画分をシリカゲルカラムクロマト、分取 HPLC 法にて精製し、活性物質 16T088A(**1**)および 16T088B(**2**)をそれぞれ 190 mg および 15 mg 得た。**1** の分子式は高分解能質量分析により、$C_{32}H_{26}O_{16}$ であり、平面構造は $^{1}$H-NMR、$^{13}$C-NMR および各種二次元 NMR の解析から推定した。この際、$^{13}$C-NMR の測定結果では、炭素のシグナルが 16 本であり、与えられた分子式 $C_{32}H_{26}O_{16}$ と比較すると半分であったため、**1** は左右対称の二量体化合物であると判断した。この結果、**1** は既知の抗生物質、アクチノロージン類縁体で、分子内に 2 つのエポキシドを持った化合物であると推定した。**2** の分子式は、**1** と同様の方法で $C_{16}H_{14}O_5$ と推定した。また、**2** の各種 NMR スペクトルは **1** とよく似ていたが、炭素の数が **1** の半分であった。このことから、**2** は **1** の類縁体であるが、**2** が二量体、**1** が単量体の関係にあることが示された。**1**、**2** は共に枯草菌に対する抗菌活性を示したが、現在、他の種の菌株に関する抗菌効果について評価を行っている。また、培養条件の検討や各種誘導化反応などにより、関連化合物の取得についても検討を進め、これを用いて化合物の構造と生理活性の関係について評価を行う。

actinorhodin, *Streptomyces* sp.

発表責任者：菰田俊一（komoda@myu.ac.jp）

講演番号：3C13a07
講演日時：3 月 19 日 11:00～ C 校舎 13 会場

流木より分離した糸状菌 *Cylindrocarpon* sp. SY-39 株が生産する物質について
New Metabolites from *Cylindrocarpon* sp. SY-39 from a Driftwood
○鈴木 拓馬[1]、吉田 誠也[1]、網干 貴子[1]、村山 哲也[1]、小関 卓也[1]、上杉 祥太[2]、木村 賢一[2]、塩野 義人[1] ([1]山形大農、[2]岩手大院・連合農)
○ Takuma SUZUKI[1], Seiya YOSHIDA[1], Takako ABOSHI[1], Tetsuya MURAYAMA[1], Takuya KOSEKI[1], Shota UESUGI[2], Ken-ichi KIMURA[2], Yoshihito SHIONO[1] ([1]Yamagata Univ., [2]The Unit. Grad. Sch. of Agri. Sci., Iwate Univ.)

【目的】我々のグループは、新しい構造を持つ生理活性物質の発見を目的に微生物の代謝産物を中心に探索してきた。本発表では、庄内海岸に流れ着いた流木より分離した糸状菌 *Cylindrocarpon* sp. SY-39 株の培養物に新たな代謝産物が見られたので、これらの構造と活性について報告する。
【方法と結果】分離糸状菌 SY-39 株の培養物のメタノール抽出物を TLC 上での発色を指標に各種カラムクロマトグラフィーにより精製し、7種の化合物 **1**～**7** を単離した。このうち、**1**～**5** は新物質であり、**6** と 7 は既知物質であった。
高分解能マススペクトルデータより、**1** は、$C_{10}H_{18}O_4$ であると決定した。次に、**1** の $^{1}H$, $^{13}C$-NMR と二次元 NMR データの解析により、分子内に $\alpha$-ピロンと 2,4-ジヒドロキシペンタンを部分構造に有することが分かった。さらに それらを HMBC 相関により連結させ、**1** の構造を決定した。二つの水酸基の立体については、新モッシャー法により決定した。化合物 **2** は **1** と同一の分子式を示し、NMR データより、**2** は **1** の $\alpha$-ピロンが開環した類縁物質であった。化合物 **3** と **7** は、NMR データより、どちらも共に $\alpha$-ピロン環を有し、HMBC 相関により、ドデカトリエン酸とヘキセノン酸の誘導体がそれぞれピロン環に結合した物質であることがわかった。化合物 **4** と **5**,**6** は、共に 10 員環ラクトンを共通の部分構造として有し、NMR データを詳細に検討した結果、3-ヒドロキシプロパン酸、メトキシ基、ヒドロキシ基がそれぞれのラクトンに結合した物質であることが判明した。なお、**2** は弱い抗菌活性を示し、**4** のメチルエステル誘導体は、HL60 細胞に対して細胞毒性を示した（$IC_{50}$ = 30.3 $\mu$M ）。

*Cylindricarpon* sp., endophyte, α-pyrone

講演番号：3C13a08
講演日時：3 月 19 日 11:15～ C 校舎 13 会場

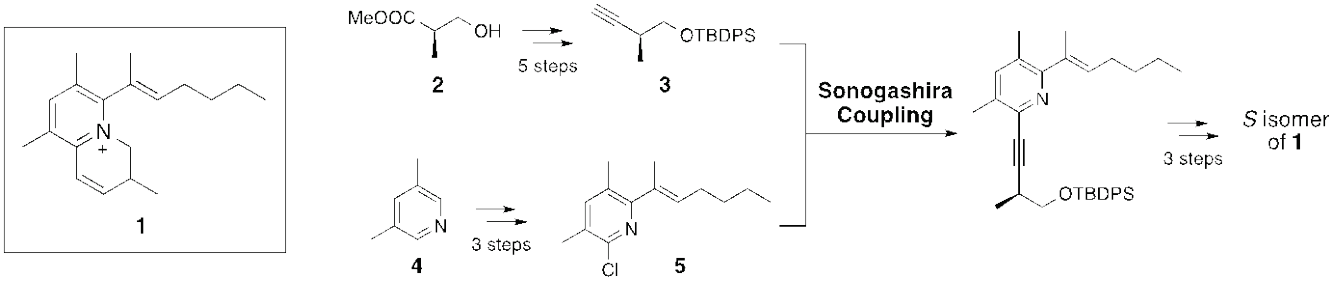
# 3,4-Dihydroquinolizinium 環を有する新規天然物の単離，構造決定および生物活性評価

# Isolation, structural determination and biological evaluation of a novel natural product having a 3,4-dihydroquinolizinium ring

○澤木 裕紀、中川 優、木村 高啓、戸村 友彦、小鹿 一（名大院・生命農）
○Yuki SAWAKI, Yu NAKAGAWA, Takahiro KIMURA, Tomohiko TOMURA, Makoto OJIKA (Nagoya Univ.)

【目的】 *Actinomyces sp*. TP-A0019 は，糖結合性天然物 pradimicin に代表されるユニークな芳香族化合物を生産する放線菌である．我々は，本放線菌の培養液が HeLa S3 (SC) 細胞に対して顕著な毒性を示すことを見出した．そこで本研究では，放線菌培養液から細胞毒性を示す化合物を単離・同定することを目的とした．

【方法と結果】 放線菌培養液の濃縮物を HeLa S3 (SC) 細胞に対する毒性を指標として各種クロマトグラフィーで精製し，新規化合物 (**1**) を 6.6 mg 単離した．$^{1}$H-, $^{13}$C-NMR 及び各種二次元 NMR スペクトル解析と質量分析によりその平面構造を決定したところ，本化合物が 3,4-dihydroquinolizinium 環を母核とする極めて稀な天然物であることが明らかとなった．本化合物は，HeLa-S3 細胞に対して毒性を示すほか ($IC_{50}$ = 0.36 μM)，*Phytophtora capsici* に対して弱いながらも抗疫病菌活性を示すことも確認された．本化合物の 3 位の立体配置は，二つの立体異性体を化学合成して決定することとした．*S* 体は，市販の methyl (*R*)-3-hydroxyisobutyrate (**2**) から誘導したアルキンユニット (**3**) と 3,5-lutidine (**4**) から合成したクロロピリジンユニット (**5**) を薗頭反応でカップリングした後，環化反応にて 3,4-dihydroquinolizinium 環を形成することにより合成した．現在 *R* 体の合成を進めているところである．




Antibiotic, Dihydroquinolizinium, Enantioselective synthesis

講演番号：3C13a09
講演日時：3 月 19 日 11:30～ C 校舎 13 会場

# クロイソカイメン共生菌が生産する新規有毒二次代謝産物の探索

# Screening of novel toxic secondary metabolites from symbiotic bacteria of the marine sponge Halichondria okadai

○菊池 颯、岡田 華弥、長 由扶子、山下 まり、此木 敬一（東北大農）
○Sou KIKUCHI, Kayo OKADA, Yuko CHO, Mari YAMASHITA, Keiichi KONOKI (Tohoku Univ.)

【背景・目的】クロイソカイメン（*Halichondria okadai*）は関東以南の潮間帯に生息する黒色スポンジ状の多細胞生物であり、微生物を濾過摂取するフィルターフィーダーである。クロイソカイメンからはこれまでに多くの有毒二次代謝産物が単離・同定されており、その多くが共生微生物由来であると考えられている。クロイソカイメンから単離された有毒化合物の代表的な例としては、下痢性貝毒の原因物質として知られるオカダ酸（Okadaic acid, OA）[1] が挙げられる。近年では、メタゲノムライブラリーを用いた化合物のスクリーニング [2] により、ハリクロム A などが単離・同定されているが、これら化合物の生合成遺伝子は同定されていない。本研究では、より簡便に新規有毒二次代謝産物のスクリーニングを行うため、クロイソカイメンより共生菌を単離・同定し、各種生理活性試験により新規有毒二次代謝産物の探索を目指すこととした。

【実験方法】まず、31 種の培地組成・酸素の有無・6 種の培養方法・2 種の温度条件の組み合わせによって 48 種の共生菌を培養・純化し、遺伝子配列解析により同定した。その後、共生菌培養液を遠心分離し、上清と菌体についてそれぞれ酢酸エチルを用いて抽出操作を行った。抽出試料を用いて細胞毒性試験・溶血性試験・ブラインシュリンプ致死活性試験を行い、複数の試験において陽性を示した画分を活性画分とした。活性画分は、シリカゲルオープンカラム・逆相 HPLC を用いて精製した。単離した化合物群は、LC/MS 分析と各種 NMR 解析により構造を推定した。

【結果・考察】48 種の共生菌のうち、複数の生理活性試験に対して陽性を示した菌株は 4 種（*Lysinibacillus* 属、*Pseudomonas* 属、*Streptomyces* 属、*Brevibacillus* 属）であり、菌株から HPLC 精製した化合物群を LC/MS 分析・各種 NMR 解析に供したところ、*Lysinibacillus* 属の菌体抽出物に 2,5-bis-(3-indolylmethyl)-pyrazine[3]（Fig. 1）様の新規化合物が存在すると推定した。また、この化合物は pH 依存的性質を有しており、pH によって NMR の化学シフトが変化すると考えられる。

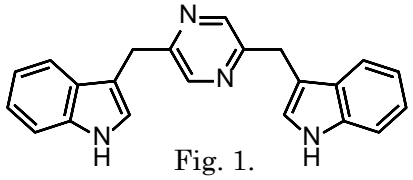


Fig. 1.
2,5-bis-(3-indolylmethyl)-pyrazine

【参考文献】

1）Tachibana *et al*., *J. Am. Chem. Soc*. **1981**, *103*, 2469.
2）Abe *et al*., *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **2012**, *76*, 633.
3）Mohamed *et al*., *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1660.

Marine sponge Halichondria okadai, Natural products, symbiotic bacteria

発表責任者：菊池颯（kikuso.3719@gmail.com）

講演番号：3C13p01
講演日時：3 月 19 日 14:00～ C 校舎 13 会場

黒穂菌とマコモの共生に関する化学的研究
Chemical studies on symbiosis between *Zizania latifolia* and *Ustilago esculenta*
○西山 祐貴[1]、小堀 一[2]、崔 宰熏[3]、徳山 真治[3]、平井 浩文[3,4]、河岸 洋和[2,3,4] ([1]静岡大院・総合農、[2]静大院・創造、[3]静大農・応生化、[4]静大・グリーン研)
○Yuki NISHIYAMA[1], Hajime Kobori[2], Jae-Hoon Choi[3], Shinji Tokuyama[3], Hirofumi Hirai[3,4], Hirokazu Kawagishi[2,3,4] ([1]Grad. Sch. of Integr. Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [3]Fac. of Agric., Shizuoka Univ., [4]RIGST, Shizuoka Univ.)

【目的】
マコモタケはイネ科マコモ属に属するマコモ (*Zizania latifolia*) が黒穂菌 (*Ustilago esculenta*) に感染することで、茎の根元が肥大し生じる共生体であり、中華料理では高級食材として知られている。この肥大の原理として、黒穂菌が感染するとオーキシンが盛んに分泌され、茎での細胞分裂が活性化し、肥大化することで形成されるという説がある。これまでに、我々はオーキシン以外の肥大化誘導物質が存在すると仮定し、その原因物質の探索を試みてきた。現在までにマコモタケから6化合物[1-3]、黒穂菌培養ろ液から2化合物[4]を新規物質として単離したが、植物に対する活性は見いだしていない。そのため本研究では黒穂菌培養ろ液から更なる化合物の探索を行い、単離した化合物を活性試験に供することで黒穂菌とマコモの共生関係のメカニズムを解明することを目的とした。
【方法・結果】
黒穂菌を約1週間、ポテトデキストロース培地によって液体培養した。得られた培養液を濾過し、菌体および培養ろ液に分けた。培養ろ液を*n*-ヘキサン、酢酸エチル、*n*-ブタノール、メタノールおよび水で順次抽出した。以前の研究より酢酸エチル可溶部にレタス伸長阻害活性が見られたため、酢酸エチル可溶部の分画を進めた。現在、酢酸エチル可溶部から単離した化合物の構造解析を行っているほか、更なる化合物の探索及び単離した化合物を用いて各種活性試験を行っている。

1) J.-H. Choi, *et al*., *Tetrahedron Lett*. **55**, 3596-3599, (2014)
2) T. Suzuki, *et al*., *Bioorga. Med. Chem. Lett*. **22**, 4246-4248, (2012)
3) H. Kawagishi, *et al*., *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **70**, 5481-5483, (2013)
4) 西山ら、平成 28 年度日本農芸化学大会講演要旨集 p.123

Zizania latifolia, Ustilago esculenta, isolation

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3C13p02
講演日時：3 月 19 日 14:15～ C 校舎 13 会場

サケツバタケ(*Stropharia rugosoannnulate*)からの生体機能性物質の探索
Search for biologically functional compounds from *Stropharia rugosoannnulate*
○清水 俊吾[1]、呉 静[2]、崔 宰熏[1,2]、平井 浩文[1,2]、河岸 洋和[1,2,3] ([1]静大院農・応生科、[2]静大院・グリーン研、[3]静大院・創造)
○Shungo Shimizu[1], Jing Wu[2], Jae-Hoon Choi[1,2], Hirofumi Hirai[1,2], Hirokazu Kawagishi[1,2,3] ([1]Fac. of Agric., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ.)

［目的］
サケツバタケ(*Stropharia rugosoannulate*)はモエギタケ科モエギタケ属のキノコであり、日本、ヨーロッパ、北アメリカ、ニュージーランド等に自生している。サケツバタケは珍しい食用キノコであり、豊富なタンパク質、ビタミン、ミネラルと多糖類が含まれ、非常に高い薬用価値と食用価値が期待されている。過去に当研究室ではサケツバタケ子実体のヘキサン可溶部より新規性の高い骨格を持つ strophasterol A-Dが単離されている[1, 2)]が、酢酸エチル可溶部の研究はあまり行われていない。本研究ではサケツバタケ子実体からの生体機能性物質の単離、精製、構造決定を行い、さらに活性評価をすることを目的とした。

[方法および結果]
サケツバタケ子実体を 70%エタノール、アセトンで抽出し、エバポレーターを用いて減圧濃縮を行った。得られた抽出部を分液ロートで液-液分配を行い、ヘキサン、ジクロロメタン、酢酸エチル、エタノールおよび水で順次抽出し、各可溶部が得られた。酢酸エチル可溶部をフラッシュクロマトグラフィーや HPLC で分画し、化合物の単離・精製を試みた。その結果、isopimarinol、kauranol を含む化合物数種を単離することに成功した。単離された化合物の構造は各種 NMR、MS スペクトル、X 線結晶構造解析データによって同定された。単離した化合物を活性試験に供し、これら化合物の各種活性について現在検討中である。

1) Wu, J. *et al, Angew. Chem., Int. Ed. Engl.,* 51, 10820-10822 (2012)
2) 呉 静ら、平成 25 年度日本農芸化学会大会講演要旨集 p.175

*Stropharia rugosoannulate*, biologically functional compound, structure determination

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3C13p03
講演日時：3 月 19 日 14:30～ C 校舎 13 会場

ヤマブシタケ(*Hericium erinaceus*)培養ろ液由来の生体機能物質の探索
Search for biologically functional compounds from culture broth of *Hericium erinaceus*
○内田 和輝[1]、呉 静[2]、崔 宰熏[1,2]、徳山 真治[1]、平井 浩文[1,2]、河岸 洋和[1,2,3] ([1]静大院・総合農、[2]静大・グリーン研、[3]静大院・創造)
○Kazuki UCHIDA[1], Jing WU[2], Jae-Hoon CHOI[1,2], Shinji TOKUYAMA[1], Hirohumi HIRAI[1,2], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3] ([1]Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka Univ., [2]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka Univ., [3]Educational Division, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka Univ.)

【背景・目的】
ヤマブシタケ（*Hericium erinaceus*）は、サンゴハリタケ科サンゴハリタケ属の可食性のキノコである。北半球温帯に広く分布し、夏の終わりから秋にかけて、広葉樹の倒木や立木の高いところに発生する。
過去に当研究室は、この菌の菌糸体培養ろ液から HeLa 細胞に対して増殖阻害活性を示す erinapyrone A、B を単離し[1)]、酢酸エチル可溶部からは植物成長調節活性を示す化合物を単離したことを報告した[2)]。そして、昨年度の本大会ではヘキサン可溶部から 7 種の化合物を単離したことを報告した[3)]。
そこで、本研究では培養ろ液ヘキサン可溶部からの更なる生理活性物質の単離、精製、構造決定および活性評価を目的とした。

【方法・結果】
2 週間培養ろ液を減圧濃縮後、ヘキサンおよび酢酸エチルで順次液－液分配し、減圧濃縮後、各可溶部を得た。得られたヘキサン可溶部をフラッシュカラムクロマトグラフィー、HPLC 等を用いて分画し、化合物の単離・精製を試みた。
ヘキサン可溶部から数種の化合物の単離に成功した。MS、IR および各種 NMR スペクトルにより新規化合物の構造を決定し、数種の既知化合物を同定した。
これらの化合物を植物成長調節活性試験に供したところ、レタスの根および胚軸に対して、活性を示した。また、ほかの菌類への影響を確かめる活性試験に供し、観察中である。

1) Kawagishi, H. *et al., Chem. Lett.,* **21**, 2475-2476 (1992)
2) Wu, J. *et al., J. Nat. Prod.,* **78**, 155-158 (2015)
3) 内田ら、平成 28 年度日本農芸化学大会講演要旨集 p.122

*Hericium erinaceus*, biologically functional compound, structural determination

発表責任者：内田和輝（uchida.kazuki.16a@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3C13p04
講演日時：3 月 19 日 14:45～ C 校舎 13 会場

# ヤマブシタケ胞子由来の生理活性物質の探索

# Search for biologically functional compounds from spore of *Hericium erinaceus*

○石岡 達朗[1]、呉 静[2]、崔 宰熏[1,2]、平井 浩文[1,2]、河岸 洋和[1,2,3] ([1]静大農・応生化、[2]静大・グリーン研、[3]静大院・創造)
○Tatsuro ISHIOKA[1], Jing Wu[2], Jae-Hoon Choi[1,2], Hirofumi Hirai[1,2], Hirokazu Kawagishi[1,2,3] ([1]Fac. of Agric., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ.)

【目的および背景】

ヤマブシタケ（*Hericium erinaceus*）は、サンゴハリタケ科サンゴハリタケ属の可食性のキノコである。過去に当研究室では、認知症の予防や治療への有効性が指摘されている神経成長因子の合成を促す物質として、hericenone類およびerinacine類をヤマブシタケ子実体および菌糸体から発見し、培養ろ液からerinapyrone類およびerinaceolactone類を発見した[1, 2)]。しかし、胞子に関する研究は行われていなかった。そこで、ヤマブシタケ胞子抽出液の子実体発生誘導活性試験が行われ、酢酸エチルおよびアセトン可溶部でエノキタケに対して菌糸体生長阻害活性が示された。そこで本研究ではヤマブシタケ胞子由来の生理活性物質の単離、精製、構造決定を試みた。

【方法および結果】

ヤマブシタケ胞子をミキサーで粉砕したのち、ヘキサン、酢酸エチル、アセトン、エタノール、水で順次抽出し、固-液分配により、各可溶部を得た。得られた酢酸エチル可溶部をフラッシュクロマトグラフィー、HPLC等を用いて分画し、化合物の単離・精製を試みた。その結果、数種の化合物の単離に成功した。これらの化合物の構造はMS、IRおよび各種NMRスペクトルにより決定した。これらの化合物を各種活性試験に供し、生理活性について検討する予定である。

1）河岸洋和，キノコからの生態機能分子，*有機合成化学協会誌*，68, 514-521 (2010)
2）Jing Wu et al, *J. Nat, Prod.* 78, 155-158, 2014

*Hericium erinaceus*, structural determination, biologically functional compound

講演番号：3C13p05
講演日時：3 月 19 日 15:00～ C 校舎 13 会場

ナラタケ属の産生する生理活性物質に関する化学的研究
Chemical studies on bioactive compounds from *Armillaria* sp.
○森 拓未[1]、関谷 敦[2]、呉 静[3]、崔 宰熏[1,3]、平井 浩文[1,3]、河岸 洋和[1,3] ([1]静大農・応生化、[2]森林総研、[3]静大・グリーン研)
○Takumi Mori[1], atsushi Sekiya[2], Jing Wu[3], Jae-Hoon Choi[1,3], Hirofumi Hirai[1,3], Hirokazu Kawagishi[1,3] ([1]Fac. of Agric., Shizuoka Univ., [2]FFPRI, [3]RIGST, Shizuoka Univ.)

【目的】

タマバリタケ科ナラタケ属 (*Armillaria* sp.) に属する一連のキノコは、現在40種類程が種として認められているが、多数の亜種や変種に富むことが知られている。また、古くから世界中の広い地域で食用として利用されてきた。その一方で、ナラタケ属のキノコは生きている植物に対する影響が非常に強く、その寄生による病害は「ナラタケ病」と呼ばれている。また、ナラタケ属のキノコは他の菌類に対する影響も強く、タマウラベニタケ (*Entoloma abortivum*) やオオミノミミブサタケ (*Wynnea americana*) は近傍にナラタケの菌糸があると奇形子実体を生じることが知られている[1]。しかし、「ナラタケ病」や他の菌類に対する奇形子実体誘導の化学的解明は一切なされていなかった。

そこで我々は研究を開始し、現在までに2種のナラタケ属菌株（488株および543株）の培養ろ液からレタスの根や胚軸に対して植物成長調節活性や、複数のキノコに対して菌糸体伸長抑制活性、奇形子実体誘導活性を有する複数の化合物の単離を報告していた[2,3]。本研究では、543株からの更なる生理活性物質の探索を目的とした。

【方法・結果】

ナラタケ属543菌株を約3週間、ポテトデキストロース培地によって液体培養することで得られた培養液を濾過し、菌糸体および培養ろ液に分けた。菌糸体を*n*-ヘキサン、酢酸エチル、エタノールおよび水で抽出し、順次分画した。このうち酢酸エチル可溶部から4種類の新規化合物および数種類の既知化合物の単離に成功した。これらの化合物の構造はMS、IRおよび各種NMRスペクトルにより決定した。また、それらの化合物のうち収量の多いものをキノコの菌糸体に対する成長調節活性試験に供した。

1) 安藤　洋子, 千葉菌類談話会通信 2000, 16-17 号, 19-25
2) H. Kobori *et al*., *Tetrahedron lett*. 2013, 54, 5481-5483
3) H. Kobori *et al*., *J. Nat. Prod.*, 2015, 78, 163-167.

*Armillaria* sp., structure determination, mycelium

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3C13p06
講演日時：3 月 19 日 15:25～ C 校舎 13 会場

オオシロカラカサタケ由来の機能性物質の探索
Search for functional compounds from *Chlorophyllum molybdites*
○大浦 健[1]、呉 静[2]、崔 宰熏[1,2]、平井 浩文[1,2]、河岸 洋和[1,2,3] ([1]静大農・応生化、[2]静大・グリーン研、[3]静大院・創造)
○Takeru OURA[1], Jing Wu[2], Jae-Hoon Choi[1,2], Hirofumi Hirai[1,2], Hirokazu Kawagishi[1,2,3] ([1]Fac. of Agric., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ.)

【目的】
オオシロカラカサタケ(*Chlorophyllum molybdites*)はハラタケ科オオシロカラカサタケ属に属するキノコで、西日本、東海地方で春から秋にかけてみられる。モリブドフィリシン（マウス致死性毒)、ステロイド類（細胞毒）など強い毒性を持つと知られており[1)]、食べると嘔吐、下痢、腹痛などの消化器系の中毒症状がでる毒キノコである。本研究ではオオシロカラカサタケの子実体，培養菌糸体由来の新規機能性物質の探索を目的とした。
【方法・結果】
１）菌糸体
オオシロカラカサタケを30日間、ポテトデキストロース培地によって液体培養し、得られた培養液をろ過し、菌糸体及び培養ろ液に分けた。菌糸体をヘキサン、酢酸エチル、エタノールおよび水で順次抽出した。ヘキサン可溶部を各種クロマトグラフィーによって分画し、数種の化合物の単離に成功した。現在、NMRやMSなどの各種機器分析により、単離した化合物の構造解析を行う一方で、更なる化合物の探索及び単離した化合物を用いて各種活性試験を行っている。

２）培養ろ液
培養ろ液を分液ロートを用いてヘキサン、酢酸エチル、エタノールおよび水で順次液-液分配した。酢酸エチル可溶部を各種クロマトグラフィーによって分画し、数種の化合物の単離に成功した。現在、NMRやMSなどの各種機器分析により、単離した化合物の構造解析を行う一方で、更なる化合物の探索及び単離した化合物を用いて各種活性試験を行っている。

３）子実体
オオシロカラカサタケ子実体をエタノール、アセトンで順次抽出し、抽出液を減圧濃縮後、ヘキサン、酢酸エチル、エタノール、水で順次抽出した。現在、エタノール可溶部を各種クロマトグラフィーによって分画し、化合物の探索を行っている。
1）大杉晃一ら『おいしいきのこ毒きのこハンディ図鑑』102p 18-22 主婦の友社 (2010)

*Chlorophyllum molybdites*, structural determination, mushroom

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3C13p07
講演日時：3 月 19 日 15:40～ C 校舎 13 会場

Study on biologically functional compounds from the edible mushroom *Cortinarius caperatus*

○Arif Yanuaru RIDWAN[1], Jing WU[2], Jae-Hoon CHOI[1,2,3], Hirofumi HIRAI[1,2,3], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3,4] ([1]Grad. Sch. of Integrated Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Fac. Agric., Shizuoka Univ., [4]Grad. Sch. of Sci. and Tech. Shizuoka Univ.)

## [Background]

*Cortinarius caperatus* (gypsy mushroom in English; Shogenji in Japanese) is an edible mushroom and widely grows in temperate part of the northern hemisphere. Previous study revealed that this mushroom possessed an antiviral inhibitor, RC-183, towards Herpes simplex virus[1]. In addition, it was previously reported that (*S*)-2-aminoethyl-L-cysteine from the mushroom exhibited antibacterial activity[2]. However, further studies on secondary metabolites as well as the biological activities of the mushroom have not been carried out yet.

## [Method and Results]

The fruiting bodies of *C. caperatus* were crushed and extracted with EtOH and then with acetone. The EtOH and acetone extracts were combined, concentrated and partitioned with hexane, ethyl acetate, and butanol, succesively. The crude extracts of EtOAc were subjected to silica gel column chromatography to yield 19 fractions and further purified by HPLC. During our ongoing research, several compounds were isolated. Their chemical structures were determined by interpretation of IR, MS and NMR spectra. In order to evaluate the biological activities, those compounds were examined against fungus and lettuce growth.

1)F. Piraino, C.R. Brandt, *Antiviral Research* 1999, **43**, 67–78
2)N. Matsumoto, *Journal of the Medical Society of Toho University* 1984, **31**, 249 -264

*Cortinarius caperatus*, structure determination, mycelium/plant growth regulating compound

発表責任者：Hirokazu Kawagishi（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3C13p08
講演日時：3 月 19 日 15:55～ C 校舎 13 会場

# フェアリー化合物によるキノコ菌糸体の成長制御に関する研究
# Studies on growth regulation of mycelia by fairy chemicals

○呉 静[1,2]、内田 和輝[3]、崔 宰熏[1,3]、平井 浩文[1,3]、菅 敏幸[4]、河岸 洋和[1,3,5] ([1]静大・グリーン研、[2]日本学振、[3]静大院・総合農、[4]静県大・薬、[5]静大院・創造)
○Jing Wu[1,2], Kazuki Uchida[3], Jae-Hoon Choi[1,3], Hirofumi Hirai[1,3], Toshiyuki Kan[4], Hirokazu Kawagishi[1,3,5] ([1]RIGST, Shizuoka Univ., [2]JSPS, [3]Grad. Sch. of Integr. Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [4]Sch. of Pharm. Sci., Univ. of Shizuoka, [5]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ.)

【目的】当研究室ではフェアリーリングを引き起こすキノコであるコムラサキシメジから植物成長物質、2-azahypoxanthine(AHX)とimidazole-4-carboxamide(ICA)を発見した[1,2]。その後、植物体内でのAHXの代謝産物2-aza-8-oxohypoxanthine(AOH)を得た（AHX, ICA, AOHをフェアリー化合物、fairy chemicals, FCsと称する）。そして、AHXとAOHが普遍的に植物に内生していることを証明し、生合成経路の一部も明らかにした。さらにFCsで処理した全ての植物の成長が制御された。これらのことから、FCsが新しい植物ホルモンであることを示唆された[3]。一方、FCsはもともとキノコから単離されたため、我々はFCsがキノコの中でも重要な役割を担うと考えた。昨年度本大会で、FCsはマツタケとトリュフを含む多くのキノコでの内生を確認し、エノキタケとブナシメジに対して子実体発生誘導活性を報告した[4]。本研究では、フェアリー化合物はさらなるキノコ菌糸体の成長影響を調査した。
【方法および結果】2, 10, 50, 200, 1000 nM各濃度のFCsを添加した浜田培地で、マツタケ菌糸体を用いて17週間液体培養を行って、FCsの菌糸成長を観察した。その結果、50 μMのAOHとICAを添加した培地で、マツタケ菌糸体の成長促進活性が確認された。さらにこのマツタケ菌糸体から２次代謝産物の単離精製を行った。また、フェアリー化合物による菌糸体の成長制御に関するアッセイを繰り返し、再現性、至適濃度などを検討している。

1) Choi et al: J. Agric. Food Chem., 58, 9956-9959, 2010
2) Choi et al: ChemBioChem, 11, 1373-1377, 2010
3) Choi et al: Angew. Chem. Int. Ed., 53, 1553-1555, 2014
4) 呉静ら、平成28年度日本農芸化学会大会講演要旨集、P120

mycelium growth regulation, *Tricholoma matsutake*, fairy chemicals

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3C13p09
講演日時：3 月 19 日 16:10～ C 校舎 13 会場

スギヒラタケの産生する毒性物質に関する生化学的研究
Biochemical studies on toxic substances produced by *Pleurocybella porrigens*

○稲吉 里美[1]、荒井 勇人[1]、鈴木 智大[2]、崔 宰熏[1,3]、道羅 英夫[3]、恒松 雄大[4]、渡辺 賢二[4]、平井 浩文[1,3]、河岸 洋和[1,3,5] ([1]静大院・総合農、[2]宇都宮大学・バイオサイエンス教育研究センター、[3]静大・グリーン研、[4]静岡県大・薬、[5]静大院・創造)
○Satomi INAYOSHI[1], Yuto ARAI[1], Tomohiro SUZUKI[2], Jae-Hoon CHOI[1,3], Hideo DOURA[3], Yuta TSUNEMATSU[4], Kenji WATANABE[4], Hirofumi HIRAI[1,3], Hirokazu KAWAGISHI[1,3,5] ([1]Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University, [2]Center for Bioscience Research and Education, [3]Research Institute of Green Science and Technology, [4]Department of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, [5]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University)

【目的】
2004年、東北・北陸地方を中心に原因不明の急性脳症が発生し、患者数は59名に達し、17名の患者が亡くなった。そのうち59例中55名はスギヒラタケ（*Pleurocybella porrigens*）を摂取しており、51名が腎機能障害を持っていた。このことから、スギヒラタケが急性脳症の原因であることが予想されたが、未だその発症機構は不明である。我々は現在までに、スギヒラタケからレクチン(PPL)の分離・精製に成功し、そのアミノ酸配列およびcDNA塩基配列情報の取得に成功している[1)]。またPPLとスギヒラタケ致死性高分子(B3)を混合するとプロテアーゼ活性を示し、血液脳関門を破壊することを報告している[2)]。さらに、スギヒラタケエタノール可溶部よりミエリン鞘を構成するオリゴデンドロサイトに毒性を示すpleurocybellaziridineの単離にも成功している[3,4)]。しかしながら、B3は難溶性であるため未だ一次構造が不明である。またPPL単独でもプロテアーゼ活性が表れる場合がある。その時のMS解析においてPPLのピークのほかに*m/z* 13,000付近にピークが確認されたためこの物質がB3と同様にプロテアーゼ活性に関与している可能性が示唆された[5)]。本研究ではこの物質をPP-13,000と命名し、一次構造の決定および異種発現系の構築を試みた。

【方法および結果】
MALDI-TOF-MS測定における*m/z* 13,000のピークを指標とし、PPL粗精製画分からPP-13,000を精製し、これをLC-MS/MSに供した。次いで*de novo*シーケンス解析・タンパク同定ソフトウェアPEAKSを用いて、取得したMS/MSデータをスギヒラタケトランスクリプトームデータベースに対して検索を行った。その結果、相同性の高い4個の配列が確認できた。PP-13000の候補として4つのタンパク質(遺伝子)を同定した。現在、各候補遺伝子の全長クローニング、異種発現によるリコンビナントPP-13000タンパク質の獲得により、その機能解明を目指している。

1) Suzuki, T., et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, 702-709 (2009)
2) 鈴木智大ら、第 52 回天然有機化合物討論会講演要旨集、p. 655(2010)
3) Wakimoto, T., et al., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 50, 1168-1170 (2011)
4) 河岸洋和、菅敏幸、化学と生物、51(3) 、134-137 (2013)
5) 藤田基寛ら、2012 年日本農芸化学会大会講演要旨集

*Pleurocybella porrigens*, toxic substances, PPL

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3C13p10
講演日時：3 月 19 日 16:25～ C 校舎 13 会場

# ツキヨタケ(Ompharotus guepiniformis)の子実体に含まれる成分について

# Constituents from fruiting body of Ompharotus guepiniformis

○青木 聡樹、塩野 義人、網干 貴子、村山 哲也（山形大農）
○Satoki AOKI, Yoshihito Shiono, Takako Aboshi, Tetsuya Murayama (Yamagata Univ.)

【目的】当研究グループでは、高等植物及び菌類に含まれる生理活性物質について研究し続けてきた。今発表では、その一環として、ツキヨタケに含まれる成分に着目し、セスキテルペン類の化合物を得たので報告する。
【方法と結果】山形県朝日村で採集したツキヨタケ子実体 3.4kg をメタノールに浸漬した後、ヘキサンと酢酸エチル、ブタノールで分画した。レタス幼植物体を使った植物成長調節活性試験で地下部の成長を抑えたブタノール画分について TLC 上での発色をもとにシリカゲルカラムクロマトグラフィーなどにより、化合物 1 を単離した。化合物 1 の GC-MS から、分子量が 232 であることが観察された。また、13CNMR 及び DEPT90°、DEPT135°から、メチル炭素 2 個とメチレン炭素 5 個、メチン炭素 4 個、四級炭素 4 個を有することが観察された。以上より分子式は C15H20O2 である事が示唆された。また 1 HNMR 及び COSY から、2.25ppm のシグナルと 1.3ppm のシグナルに相関があり、同様に 1.7ppm のシグナルと 1.5ppm のシグナル、2.25ppm のシグナルと 2.3ppm のシグナルにも相関がある事が観察された。また、HMQC より、1.3ppm と 1.7ppm の両シグナルは同一のメチレン炭素に結合した水素に由来している事が観察され、0.4 から 1ppm にシクロプロパン環特有のピークが観察されなかった事から、Illudane 骨格を有しないセスキテルペン化合物であると考えられる。

Ompharotus guepiniformis

発表責任者：青木聡樹（aoki0913@hotmail.co.jp）

講演番号：3C13p11
講演日時：3 月 19 日 16:50～ C 校舎 13 会場

# 放線菌の生産する新規 48 員環マクロライドの構造

# The structure of a new 48-membered macrolide antibiotic produced by an actinomycete.

○澤 竜一、梅北 まや、波多野 和樹、林 千草、五十嵐 雅之、梅沢 洋二（微化研）
○Ryuichi SAWA, Maya UMEKITA, Masaki HATANO, Chigusa HAYASHI, Masayuki IGARASHI, Yoji UMEZAWA (Inst. of Microbial Chemistry)

薬剤耐性菌の問題は、国境を越えた世界的な問題なってきている。従来、薬剤耐性菌に打ち勝つために、既存の限られた骨格の修飾などによる次世代半合成抗生物質の開発が行われてきた。しかしながら、多剤耐性菌の蔓延や超多剤耐性菌の出現により既存の骨格の修飾による創薬では克服が難しい状況になってきている。そのため、天然物からの新しい構造を有する抗生物質の探索は、薬剤耐性菌克服のための有用かつ革新的な新薬を開発しうるアプローチの一つとして期待されている。

我々は、多剤耐性グラム陽性菌に対して活性を示す新規化合物探索の過程で、東京都品川区の土壌より分離された放線菌 MM168-141F8 株の麦固体培養物に黄色ブドウ球菌 *Staphylococcs aureus* 等に対する抗菌活性を見出した。本生産菌は、細胞壁のジアミノピメリン酸が LL 型のみを有し、16S rRNA 相同性解析より、*Streptomyces* 属であることがわかった。本生産菌培養物の LC-HRESI/MS 分析を行ったところ、活性を示す保持時間に *m/z* 1436.9961 $(M+H)^+$のイオンを見出し、Dictionary of Natural Products データベースに該当物質が存在しなかったことから、これについて単離精製を行った。

本菌株の種培養物を麦固体培地 560 g に接種し、30ºC で 14 日間静置培養を行った。得られた培養物は、アセトンで抽出し、溶媒を濃縮の後、n-ブタノールおよび水を加えて分配した。目的の活性が n-ブタノール層に抽出されていたのでこれを濃縮乾固し、n-ヘキサンで油分を除去して粗抽出物 1.0 g を得た。得られた粗抽出物は、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより活性を示したクロロホルム/メタノール/水＝10:5:1 の画分を集めて溶媒を留去し、339 mg の粗精製物を得た。ついで、逆相 HPLC を用いて 35%アセトニトリル-0.01%トリフルオロ酢酸水溶液で展開し、保持時間 33 分付近の単一ピークを示す目的活性画分を濃縮乾固して 55 mg の精製物を得た。

本物質は、UV スペクトルが末端吸収を示し、HRESI/MS より、その分子式を $C_{76}H_{141}NO_{23}$ と決定した。本分子式および $^1H$, $^{13}C$, DEPT135 NMR スペクトルより 1 個のカルボニル、2 個の $sp^2$ 四級炭素、6 個の $sp^2$ メチン、34 個の $sp^3$ メチン、19 個のメチレン、14 個のメチル、および 22 個の交換性水素の存在が明らかとなった。各種 2 次元 NMR および重なったメチレンシグナルを含む部分は、1D TOCSY スペクトルの解析より、本物質は、モナゾマイシンの 10 位にメチル基を有し、ラクトン環付け根の 47 位以降の側鎖長を異にする新規 48 員環マクロライドであると決定した。

本物質の抗菌活性は、最小発育阻止濃度（MIC）を測定し、薬剤耐性を含む黄色ブドウ球菌、腸球菌などに対して 0.78～3.12 μg/ml の抗菌活性を示した。

new antibiotic, 48-membered macrolide, actinomycete

発表責任者：澤　竜一（rsawa@bikaken.or.jp）

講演番号：3C13p12
講演日時：3 月 19 日 17:05～ C 校舎 13 会場

深海底泥由来放線菌の生産する新規 enediyne 系抗生物質に関する研究
A new enediyne antibiotic from the deep-sea actinomycete *Nonomuraea* sp.
○五十嵐 雅之[1]、澤 竜一[1]、梅北 まや[1]、林 千草[1]、波多野 和樹[1]、加藤 千明[2] ([1]微化研、[2]海洋研究開発機構)
○Masayuki IGARASHI[1], Ryuuichi SAWA[1], Maya UMEKITA[1], Chigusa HAYASHI[1], Masaki HATANO[1], Chiaki KATOH[2] ([1]BIKAKEN, [2]JAMSTEC)

【目的】　従来有効であった薬剤が無効となった病原菌を耐性菌といい、このうち複数の種類の薬剤が効かなくなったものを多剤耐性菌と呼ぶ。2013 年に米疾病対策センター（CDC）は、対応する抗菌薬の開発に緊急性があり重要な薬剤耐性に関連する 15 の病原菌を列挙した。中でも特にカルバペネム耐性腸内細菌科（CRE）に対しては、当時、最強の抗菌薬に位置付けられていたカルバペネムでさえも効果を示さないことから、CDC が「悪夢の耐性菌」として警鐘を鳴らしている。さらに、NDM-1 などの新しいタイプの CRE が南～東南アジアの国々やヨーロッパ各国で急激に増加傾向を示しており、CRE を含む薬剤耐性グラム陰性菌に有効な薬剤が求められている。

放線菌は抗生物質の代表的な生産生物として広く利用され、盛んに研究が行われてきた。しかし、近年では有用な新規抗生物質の発見は減少しつつある。深海は、塩濃度や栄養条件といった生育環境が陸上のものとは大きく異り、生態系としても人類未踏の領域であることから、そこに生息する放線菌から新規抗生物質を見出せる可能性がある。本研究では、深海底泥由来海洋棲放線菌から CRE に有効な新規抗生物質の探索を行った。その結果、深海底泥由来放線菌から、抗菌活性を示す新規 enediyen 系抗生物質及びその類縁体を単離したので本化合物の単離精製、構造決定および生物活性について報告を行う。

【方法・結果】　スクリーニングは、薬剤耐性腸内細菌科細菌（*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*）を用いて抗菌活性を指標に探索を行なった。この過程で、日本海溝（北緯 39°26.5346', 東経 142°12.8655', 深さ 329 m）から採取した底泥より分離した一放線菌 *Nonomuraea* sp. MM565M-173N2 株の培養液が、CRE を含む腸内細菌科細菌に強い抗菌活性を示すことを見出した。活性物質の精製・単離は、以下のように行なった。即ち、MM565M-173N2 株の培養液 220 リットルより、菌体を MeOH で抽出し濃縮後、培養上清とともに EtOAc 抽出を行なった。活性画分は、ゲル濾過および HPLC を用いて精製し、活性成分である　A (1.8 mg), B (1.5 mg), C (0.8 mg)および D (0.8 mg)をそれぞれ単離した。
A, B, C および D は、高分解能 ESIMS より、それぞれ $C_{29}H_{20}NO_8$, $C_{28}H_{20}NO_8$, $C_{29}H_{24}NO_8$ および $C_{28}H_{20}NO_7$ と決定し、4 種ともに新規物質であった。本物質の平面構造は、各種 NMR スペクトルの解析により、A は新規 enediyne 系抗生物質であると決定した。また、B, C および D は、A の芳香環化体であることが判明した。現在、立体化学構造の解析と CRE および NDM-1 を含む多剤耐性腸内細菌科に対し抗菌活性について検討を行っている。

deep-sea actinomycetes, new antibiotics, *Nonomuraea*

発表責任者：五十嵐雅之（igarashim@bikaken.or.jp）

講演番号：3C13p13
講演日時：3 月 19 日 17:20～ C 校舎 13 会場

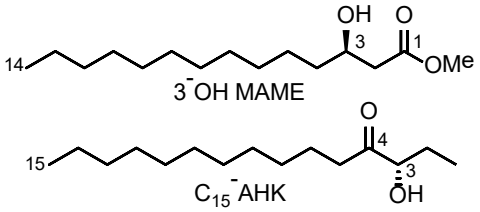
# オジギソウ窒素固定細菌 *Cupriavidus taiwanensis* は青枯病菌型とコレラ菌型のクオラムセンシング機構を 2 種有する

# *phc* and *tqs* quorum sensing in *Cupriavidus taiwanensis*, a nitrogen-fixing symbiont of *Mimosa pudica*

○脇本 隆行、谷 修治、甲斐 建次（阪府大院・生命環境）
○Takayuki WAKIMOTO, Shuji TANI, Kenji KAI (Osaka Prefecture Univ.)

【目的】β-プロテオバクテリア *Cupriavidus taiwanensis* は，オジギソウ *Mimosa pudica* を宿主とする窒素固定細菌である。本菌は植物病原菌である青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* と近縁で，その病原性に必須である *phc* クオラムセンシング（QS）系などの発現調節に関わる遺伝子群を有している。さらに，動物病原菌であるコレラ菌 *Vibrio cholerae* が持つ *tqs* QS 系も本菌ゲノムから見出されている。プロテオバクテリアで広く認められるアシルホモセリンラクトンをシグナル分子とする *lux* 系とは異なり，青枯病菌型（*phc*）とコレラ菌型（*tqs*）の QS 機構は限られた細菌種でしか確認されていない。そこで本研究では，2 大病原菌と同種の QS 機構が *C. taiwanensis* においてどのような機能を担っているのかを調べ，オジギソウ－*C. taiwanensis* 共生系への寄与を明らかにすることにした。今回，青枯病菌型とコレラ菌型 QS 機構のシグナル分子合成酵素遺伝子を大腸菌 *E. coli* でそれぞれ発現し，生じたシグナル分子の単離・構造決定を行った。さらに，合成酵素遺伝子欠損株とその相補株を作製したので報告する。

【方法と結果】*C. taiwanensis* LMG19424 株の QS シグナル分子合成酵素をコードする *phcB* と *tqsA* を pET16b と pET28a にそれぞれクローニングし，*E. coli* BL21(DE3) 株において発現した。*phcB* 発現株と *tqsA* 発現株の培養抽出物をカラムクロマトグラフィーおよび逆相 HPLC にて分画し，GC/MS に供したところ，青枯病菌 QS シグナル分子である (*R*)-methy-3-hydroxymyristate（3-OH MAME）とコレラ菌 QS シグナル分子の類縁体である (*S*)-3-hydroxypentadecan-4-one（$C_{15}$-AHK）と予想されるピークをそれぞれ検出した。合成標品の GC/MS データと比較したところ，それらは完全に一致し，PhcB と TqsA の産物が 3-OH MAME と $C_{15}$-AHK であることが明らかになった。同様に，LMG19424 株の培養抽出物からもこれらの化合物が検出され，*phc* と *tqs* QS 系が LMG19424 株において機能していることが示唆された。次に，シグナル分子合成酵素欠損株を作製するため，*phcB* と *tqsA* 遺伝子の上流と下流領域を pK18mobsacB にそれぞれクローニングし，*E. coli* S17-1(λ*pir*) 株に導入した。その S17-1 株と LMG19424 株と接合させ，分子内相同組換えにより *phcB* 欠損株と *tqsA* 欠損株を作製した。続いて，pK18mobsacB にコードされている *npt II* 遺伝子のプロモーター領域とターミネーター領域を組み込んだ pBluescript KS(+) に *phcB* と *tqsA* 遺伝子を導入し，各遺伝子相補用ベクターを構築した。それらを Δ*phcB* と Δ*tqsA* に導入することで，各 QS シグナル合成酵素遺伝子の相補株を作製した。QS 機能の解明を行っていくとともに，各種変異株のオジギソウ根粒形成能を評価する予定である。




*Cupriavidus taiwanensis*, rhizobia, quorum sensing

発表責任者：甲斐建次（kai@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：3C13p14
講演日時：3 月 19 日 17:35～ C 校舎 13 会場

青枯病菌においてクオラムセンシング制御下にある PKS-NRPS が産生するリポペプチド ralsolamycin 類の単離・構造決定
Ralsolamycins A and B, *Ralstonia solanacearum* lipopeptides synthesized by quorum sensing-dependent PKS-NRPS
○村井 勇太[1]、森 祥子[2]、曳地 康史[3]、甲斐 建次[1] ([1]阪府大院・生命環境、[2]サントリー生命科学財団、[3]高知大・農)
○Yuta MURAI[1], Shoko MORI[2], Yasufumi HIKICHI[3], Kenji KAI[1] ([1]Osaka Prefecture Univ., [2]Suntory Foundation for Life Sciences, [3]Kochi Univ.)

【目的】青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* はナス科植物を中心とした 200 種以上の植物に感染し，萎凋病を引き起こす植物病原細菌である。本菌が作る細胞外多糖（EPS）が導管を詰まらせるため，植物は萎凋・枯死する。EPS などの病原力因子の産生は菌密度に依存した遺伝子発現機構であるクオラムセンシング（QS）によって制御されており，(*R*)-methyl 3-hydroxymyristate が細胞間シグナル分子として利用されている。以前, 我々は野生株と QS 欠損株の二次代謝プロファイルの比較により ralfuranone 類を見出し，それらが病原力に重要であることを報告した。RNAseq 法を使って QS 制御下にある二次代謝物関連遺伝子の発現を調べたところ，未知代謝物の合成に関わる PKS-NRPS 遺伝子 RSp0641/0642 が見つかった。しかしアメリカのグループより，これらの遺伝子が ralsolamycin と名付けられた分子量 1291 のリポペプチドの産生を担い，青枯病菌がカビ細胞内へと感染する上で重要因子として機能することが報告された。ただし，ralsolamycin の単離・構造決定には成功していないため，本化合物の生理活性は確認されていない。一般的に，植物病原菌が作るリポペプチドは植物毒素として機能することが知られており，ralsolamycin がそのような活性を有する可能性もある。そこで本研究では，ralsolamycin 類を単離・構造決定し，それらの生理活性を明らかにすることを目指した。
【方法と結果】予備検討の結果，*R. solanacearum* OE1-1 株は 2 種の ralsolamycin 類を産生し，それらの産生は液体培地上ではほとんど認められず，寒天培地上で活性化することが分かった。そこで，OE1-1 株を BG 寒天培地培養物 600 枚で 3 日間培養し，それらを細かく刻んでアセトンで浸漬抽出した。抽出物中のアセトンを減圧留去して得た水性濃縮物を酢酸エチルで抽出し，その濃縮物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供した。LC/MS により ralsolamycin 類が含まれる画分を特定し，その画分より逆相 HPLC を用いて ralsolamycin A（3.7 mg）と B（1.3 mg）を単離した。構成アミノ酸はマーフィー法により，脂肪酸部分は酸加水分解物のヘキサン抽出物を GC/MS で分析することによりそれぞれ決定した。Ralsolamycin 類の各種 NMR スペクトルを $CD_3OD$ 中で測定し，各ユニットの構造に由来する $^{1}H$ と $^{13}C$ シグナルを帰属・同定した。また，マーフィー法では検出できない異常アミノ酸としてβ-hydroxytyrosine と dehydroalanine の存在が NMR により導き出された。現在，測定溶媒を $CD_3OH$ に変えて，ralsolamycin 類の各種 NMR スペクトルを測定している。さらに，ralsolamycin 類の生理活性と QS 機構による産生制御についても報告する予定である。

*Ralstonia solanacearum*, lipopeptides, quorum sensing

発表責任者：甲斐　建次（kai@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：3C13p15
講演日時：3 月 19 日 17:50～ C 校舎 13 会場

# アズレンの光学特性を生かした新規 CD 励起子キラリティ試薬の開発

# Development of a new azulene-based reagent for CD exciton chirality analysis

○奥 直也[1]、林 咲希[1]、村藤 俊宏[2]、五十嵐 康弘[1] ([1]富山県大生工セ・生物工、[2]山口大院創成科学)
○Naoya OKU[1], Saki HAYASHI[1], Toshihiro MURAFUJI[2], Yasuhiro IGARASHI[1] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]Yamaguchi Univ.)

Azulene は 5 員環と 7 員環が縮環した非ベンゼン系芳香族化合物であり、naphthalene の構造異性体である。しかし、その光学特性は大いに異なる。典型的には、naphthalene が無色なのに対し、azulene は濃青色を呈しており、金属を有しない最小の有機着色分子であると考えられる。

CD 励起子キラリティ法は原田宣之と中西香爾によって開発された diol 類の絶対配置決定法である。本法では、化合物中に二つの色素団を導入することにより、円二色性スペクトル上に現れる色素団間の励起子相互作用を解析し、その符号から絶対配置を非経験的に決定できる。誘導体化に必要な物質量も MTPA 法等のキラルアニソトロピー法と比べ少量で済むことから、これまで多くの天然物の絶対配置の決定に利用されてきた。

CD 励起子キラリティ法で用いる誘導体化試薬は、誘導体化し易いようサイズがコンパクトで、かつ天然物中の色素団から影響を受けない範囲に UV 吸収を持たなければならない。原田らは長波長域(310 nm)にシャープな UV 極大吸収を持つ 4-dimethylaminobenzoic acid を利用しているが、本試薬は dimethylamino 基の電子供与性共鳴効果によりカルボキシル基の反応性が著しく低下しているため、誘導体化に過酷な反応条件を要し、余り利用されていない。

我々は、azulene が上記絶対配置解析法の誘導体化試薬に適した光学特性を持つことを見出し、その有用性を azulene-2-carboxylic acid にて確認した。その詳細を講演にて紹介したい。

azulene, Circular dichroism, exciton

発表責任者：五十嵐　康弘（yas@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：3C14a01
講演日時：3 月 19 日 09:20～ C 校舎 14 会場

# 久慈産琥珀に含まれる生物活性物質の精製法の改良と新規物質の探索

# Improvement of the isolation method and identification of a biological active compound from Kuji amber

○高橋 穂乃香[1]、越野 広雪[2]、川村 哲晃[3]、清水 栄作[3]、新田 久男[4]、上杉 祥太[5]、大野 美紗[1]、木村 賢一[1,3,5] ([1]岩手大・農、[2]理研 CSRS、[3]岩手大院・農、[4]久慈琥珀（株）、[5]岩手大院・連合農)
○Honoka TAKAHASHI[1], Hiroyuki KOSHINO[2], Tetsuaki KAWAMURA[3], Eisaku SHIMIZU[3], Hisao SHINDEN[4], Shota UESUGI[5], Misa OHNO[1], Ken-ichi KIMURA[1,3,5] ([1]Fac. of Agri., Iwate Univ., [2]RIKEN CSRS, [3]Grad. Sch. of Agri., Iwate Univ., [4]Kuji Kohaku Co., Ltd., [5]The Unit. Grad. Sch. of Agri. Sci., Iwate Univ.)

【目的】我々は、琥珀を生物活性物質探索のための天然資源と捉え、$Ca^{2+}$超感受性の遺伝子変異酵母 YNS17 株（*zds1*Δ *erg3*Δ *pdr1/3*Δ）の生育回復活性を指標としたスクリーニングにより、久慈産琥珀（中生代白亜紀後期:約 8500 万年前）から、すでに新規物質 15,20-dinor-5,7,9-labdatrien-18-ol (**1**)（kujigamberol と命名）[1,2]、13-methyl-8,11,13-podocarpatrien-19-ol (**2**)、並びに 15,20-dinor-5,7,9-labdatrien-13-ol (**3**)[3] を単離した。また、天然物から初めての単離である既知の spirolactone 化合物 (**4**)[4] も見出した。他国産琥珀や現在の植物からは、**1**～**4** の化合物は未だ得られておらず、久慈産琥珀からはさらなる新規化合物の取得が期待される。しかし、これまでの精製法では活性物質の収率が低いため、精製方法の検討を行なうことにより収量を改善し、新たな生物活性物質の探索を試みた。

【方法】HPLC を用いた定量により、これまでの精製法の中で、酢酸エチル抽出の過程で **1** が約 20%しか抽出されていないことが明らかとなった。そこで酢酸エチル抽出を省き、メタノール抽出物を直接シリカゲルカラムで展開後、逆相の中圧 LC と HPLC を用いた。生物活性は、YNS17 株と 0.3 M $CaCl_2$ を混合したプレートにサンプル 5 μl を添加し、28℃、3 日間培養後生じる生育円を指標とした。

【結果】久慈産琥珀 480.73 g からメタノール抽出（20.8 g)、シリカゲルカラム[7.5 cm×15 cm、ヘキサン：酢酸エチル＝3：1、2：1、1：1（5.13 g）]、逆相中圧 LC（ODS、37×300 mm、100% MeOH)、並びに逆相 HPLC（ODS、20×250 mm、85%、75% MeOH)にて活性物質を精製したところ、**1**（59.3 mg)、**2**（9.9 mg)、並びに **3**（4.0 mg）をオイル状物質として単離した。得られた 3 化合物の収量は、これまでより約 2～10 倍増加した。収量が増加したことから、次に、これまでの **1**～**4** と保持時間が異なる生物活性物質を探索し、HPLC（ODS、20×250 mm、80% MeOH）にて 21.4 mg のオイル状物質 **5** を単離した。**5** の高分解能 EIMS の結果、分子式 $C_{19}H_{34}O$（実測値：278.2613、理論値：278.2601）であると決定した。また、各種 NMR を測定して構造を解析したところ、新規構造の 15-nor-8-labden-13-ol であると考えられた。**5** は、YNS17 株に対して **1** よりも弱い生育回復活性を示した。

1) K. Kimura, *et al.*, *Fitoterapia.*, **83**, 907 (2012)、2) Y. Q. Ye, *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 4259 (2012)、3) T. Uchida., *et al.*, 投稿中、4) E. Shimizu, *et al.*, 投稿中。

（この成果は、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）の助成事業の結果得られたものです。）

Kuji amber, 15-nor-8-labden-13-ol, *Saccharomyces cerevisiae*

発表責任者：高橋穂乃香（a8213022@iwate-u.ac.jp）

講演番号：3C14a02
講演日時：3 月 19 日 09:35～ C 校舎 14 会場

超臨界流体抽出法によって増加する久慈産琥珀の構成成分の解析
The analysis of increased constituents in Kuji amber treated by supercritical fluid extraction
○川村 哲晃[1]、越野 広雪[2]、永澤 佳之[3]、七尾 英孝[3]、白井 誠之[3]、上杉 祥太[4]、大野 美紗[5]、木村 賢一[1,4,5] ([1]岩手大院・農、[2]理研 CSRS、[3]岩手大・理工、[4]岩手大院・連合農、[5]岩手大・農)
○Tetsuaki KAWAMURA[1], Hiroyuki KOSHINO[2], Yoshiyuki NAGASAWA[3], Hidetaka NANAO[3], Masayuki SHIRAI[3], Shota UESUGI[4], Misa OHNO[5], Ken-ichi KIMURA[1,4,5] ([1]Grad. Sch. of Agri., Iwate Univ., [2]RIKEN CSRS, [3]Fac. of Sci. and Eng., Iwate Univ., [4]The Unit. Grad. Sch. of Agri. Sci., Iwate Univ., [5]Fac. of Agri., Iwate Univ.)

【目的】久慈産琥珀（中生代白亜紀後期：約 8500 万年前）は、約 5%のアルコール可溶性画分と、約 95%のアルコール不溶性のポリマー構造から成り、前者から $Ca^{2+}$シグナル伝達に関わる遺伝子変異酵母 YNS17 株（*zds1*Δ *erg3*Δ *pdr1/3*Δ）の生育回復活性を用いて、新規抗アレルギー物質 kujigamberol （15,20-dinor-5,7,9-labdatrien-18-ol）[1] 類を単離精製し、その構造と作用メカニズムを報告してきた。しかし、久慈産琥珀のポリマー構造については未解明な状態である。これまで琥珀は、熱分解 GC-MS の様な過激な条件による分析が主に行われていたため、より温和な超臨界流体分解・抽出法を用いることで、琥珀ポリマーからモノマーやダイマーなどが得られると考えた。そこで、久慈産琥珀のポリマー構造の解明と kujigamberol の生成メカニズムの手がかりを得るため、超臨界流体抽出によって増加する成分を単離精製し、構造を決めることを目的とした。
【方法】1 g の久慈産琥珀粉末を用い、超臨界メタノール抽出はメタノールあるいはメタノール-水 3.0 ml、350℃、0.5 h、また、超臨界 $CO_2$ 抽出は 80℃、30 MPa、0.5 ml/min、0.5 h の条件にて行った。HPLC 分析は、ODS カラム（85% MeOH）を用いて行った。YNS17 株は、0.3 M $CaCl_2$ を含む YPD 培地で 28℃、3 日間培養し、サンプルの生育回復活性の有無を調べた。
【結果・考察】超臨界条件で、メタノール、メタノール-水、$CO_2$ の流体条件を変化させて得られた抽出物を HPLC で分析したところ、$CO_2$ の超臨界条件でのみ増加する kujigamberol より低極性の成分 X と Y の 2 種を見出した。この成分は、久慈産琥珀メタノール抽出物自体にも含まれていたことから、久慈産琥珀をメタノール抽出、酢酸エチル抽出、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル=20：1）、逆相 HPLC（90% MeOH）により単離精製を行い、143.9 g の久慈産琥珀粉末から、X を 5.2 mg、Y を 14.6 mg 単離した。NMR 解析により、両者とも中生代白亜紀のスペイン産琥珀から単離されたノルラブダン型炭化水素化合物 amberene [2] に類似の構造が推定された。いずれも YNS17 株に対し 50 μg/spot でも生育回復活性を示さず、kujigamberol が有する水酸基が存在しないことから、kujigamberol 類の生物活性には分子内の水酸基が重要であることが示唆された。
1) K. Kimura, *et al.*, Fitoterapia, **83**, 907-912 (2012)
2) C. Menor-Salván, *et al.*, Org. Geochem., **93**, 7-21 (2016)

（この成果は、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）の助成事業の結果得られたものです。）

Kuji amber, supercritical fluid extraction, amberene

発表責任者：川村哲晃（a2216002@iwate-u.ac.jp）

講演番号：3C14a03
講演日時：3 月 19 日 09:50～ C 校舎 14 会場

# 久慈産琥珀のメタノール抽出物と超臨界流体抽出物の生物活性の比較

# Comparition of biological activity between the methanol and supercritical fluid extracts of Kuji amber

○丸山 美紅[1]、川村 哲晃[1]、永澤 佳之[2]、七尾 英孝[2]、白井 誠之[2]、鈴木 聡[3]、上杉 祥太[4]、大野 美紗[5]、木村 賢一[1,4,5] ([1]岩手大院・農、[2]岩手大・理工、[3](株)実正、[4]岩手大院・連合農、[5]岩手大・農)
○Miku MARUYAMA[1], Tetsuaki KAWAMUA[1], Yoshiyuki NAGASAWA[2], Hidetaka NANAO[2], Masayuki SHIRAI[2], Satoshi SUZUKI[3], Shota UESUGI[4], Misa OHNO[5], Ken-ichi KIMURA[1,4,5] ([1]Grad. Sch. of Agri., Iwate Univ., [2]Fac. of Sci. and Eng., Iwate Univ., [3]Misho, Co., Ltd., [4]The Unit. Grad. Sch. of Agri. Sci., Iwate Univ., [5]Fac. of Agri., Iwate Univ.)

【目的】久慈産琥珀は、約 5%のアルコール可溶性画分と、約 95%のアルコール不溶性のポリマー構造から成り、$Ca^{2+}$シグナル伝達に関わる遺伝子変異酵母 YNS17 株（*zds1*Δ *erg3*Δ *pdr1/3*Δ）に対し生育回復活性を有するメタノール抽出物と新規物質 kujigamberol （15,20-dinor-5,7,9-labdatrien-18-ol）[1] は、モルモットの鼻づまりを抑制した。今回、従来のメタノール抽出物と、久慈産琥珀に対し超臨界メタノールと超臨界 $CO_2$ で抽出を行った抽出物とで、kujigamberol を中心とする構成成分と生物活性を比較することを目的とした。
【方法】1 g の久慈産琥珀粉末を用い、超臨界メタノール抽出は、350℃、0.5 h、メタノール 3 ml、超臨界 $CO_2$ 抽出は、80℃、30 MPa、0.5 h、0.5 ml/min の条件で行った。HPLC 分析は、ODS カラム（85 % MeOH）を用いて行い、YNS17 株は 0.3 M $CaCl_2$ を含む YPD 培地で 28℃、3 日間培養し、サンプルの生育回復活性の有無を調べた。また、ラット好塩基球性白血病細胞 RBL-2H3 では、抗 DNP-IgE・DNP-BSA （Ag）、thapsigargin（Tg）、並びに A23187 刺激による脱顆粒（β-hexosaminidase 放出）抑制作用を測定した。
【結果・考察】各抽出物の収量は、従来のメタノール抽出物が 6.7%であるのに対し、超臨界メタノール抽出物が 21.5%、超臨界 $CO_2$ 抽出物が 4.3%であった。超臨界メタノール抽出物では、従来のメタノール抽出物で確認された kujigamberol のピークが消失し、新たなピークが生じた。一方、超臨界 $CO_2$ 抽出物は、kujigamberol 量は 2 倍となったが、両抽出物共に遺伝子変異酵母株と RBL-2H3 細胞に対する活性は従来のメタノール抽出物と変わらず、遺伝子変異酵母株に対してはいずれも 0.31 μg/spot まで生育回復活性を示した。また、RBL-2H3 細胞における脱顆粒抑制活性は、超臨界メタノール抽出物では、Ag 刺激：$IC_{50}$>50 μg/ml、Tg 刺激：$IC_{50}$=29.5 μg/ml、並びに A23187 刺激：$IC_{50}$=11.2 μg/ml、超臨界 $CO_2$ 抽出物では、Ag 刺激：$IC_{50}$>50 μg/ml、Tg 刺激：$IC_{50}$=8.1 μg/ml、並びに A23187 刺激：$IC_{50}$=18.0 μg/ml であった。いずれの活性も、kujigamberol 量に基づかないことから、抽出物の生物活性は、他の成分と相加・相乗的に作用しているものと考えられる。また、超臨界メタノール抽出物は、従来のメタノール抽出物や超臨界 $CO_2$ 抽出物とは全く異なるピークを持つことから、新たな成分の取得が期待できる。1) K. Kimura, *et al*., Fitoterapia., **83**, 907 (2012)
（この成果は、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）の助成事業の結果得られたものです。）

Kujigamberol, supercritical fluid extracts, RBL-2H3 cells

発表責任者：丸山美紅（a2216011@iwate-u.ac.jp）

講演番号：3C14a04
講演日時：3 月 19 日 10:05～ C 校舎 14 会場

# 新規オートファジー誘導物質(+)-エポジムノラクタムの構造活性相関

# Structure-activity relationship of (+)-epogymnolactam

○岡戸 祐治、上田 一貴、重冨 顕吾、生方 信（北大院農）
○Yuji OKADO, Kazuki UEDA, Kengo SHIGETOMI, Makoto UBUKATA (Hokkaido Univ.)

【背景・目的】 (+)-Epogymnolactam(**1**)は当研究室において *Gymnopus* sp.の菌糸体培養抽出物より単離・構造決定された化合物であり、動物細胞においてオートファジー誘導活性を示すことが確認された [1]。オートファジーは細胞が自らの細胞質成分を分解するための機構として、飢餓対応のほか、細胞内の恒常性の維持に関わっており、癌や神経変性疾患といった疾病の抑制にも関与していると考えられる。一方で、オートファジーを標的とした治療薬の開発には至っておらず、我々は(+)-epogymnolactam をリード化合物としてオートファジー制御機構に対するさらなる理解を深めることを目的とし、本化合物の全合成を達成した [2]。本研究では各種類縁体の合成と構造活性相関研究に取り組んだ。

【実験方法・結果】 (–)-Epogymnolactam の合成：シャープレスの不斉酸化と酵素による光学分割を組み合わせることで 98%ee の(–)-エポキシドを合成した後、(+)-体と同様の反応を行うことで合成した。環状類縁体の合成：**1** を CSA と共に MeOH 中で処理し、*O*-methyl 類縁体を得た。鎖状類縁体の合成：**1** の合成中間体であるラクトンからジメチルアミンを用いてアミドを導き、Dess-Martin 酸化により *N,N*-dimethyl 類縁体を得た。Deepoxy 類縁体の合成：γ-Octalactone を出発物質として、加アンモニア分解を封管で行うことでアミドを導き、Dess-Martin 酸化により deepoxy 類縁体を得た。C4 位側鎖における類縁体の合成：**1** の合成中間体であるアルデヒドに $SnCl_4$ 共存下でアリルトリブチルスズを反応させ、アリル化物を得た。LiDBB によるベンジル基の脱保護を行い、ジオールを得た。ジオールを DMN-AZADO を用いた酸化によりラクトンへと導き、加アンモニア分解によりアミドを得た。今後、1 段階の酸化を経て C4-allyllactam を合成し、オレフィンメタセシス反応により各種類縁体を合成する予定である。

オートファジー活性の評価：活性評価の方法として、ウェスタンブロット法によりオートファジー関連タンパク質 LC3 を検出した。その結果、オートファジー誘導活性において環状構造やエポキシ基が関与していることが示唆された。また、**1** の構造類縁体であるセルレニンが阻害活性を示したことから C4 位側鎖がその活性に大きく関与していることが示唆された。今後、様々な側鎖を持つ類縁体において活性評価を行う予定である。

1) S. Mitsuhashi, C. Shindo, K. Shigetomi, T. Miyamoto, and M. Ubukata *Phytochemistry* **114**, 155 (2015)
2) Y. Okado, K. Shigetomi, S. Mitsuhashi, and M. Ubukata *The Journal of Antibiotics* **68**, 712 (2015)

autophagy, structure-activity relationship, (+)-Epogymnolactam

講演番号：3C14a05
講演日時：3 月 19 日 10:20～ C 校舎 14 会場

# 安定同位体標識光反応性芳香族アミノ酸誘導体の合成

# Synthesis of stableisotope labelled and photoreactive aromatic amino acids

○橋本 誠、王 磊、崎浜 靖子、橋床 泰之（北大院農）
○Makoto HASHIMOTO, Lei WANG, Yasuko SAKIHAMA, Yasuyuki HASHIDOKO (Grad. Sch. Hokkaido Univ.)

光アフィニティーラベル法は生理活性物質の機能解析に良く利用される化学生物学的手法であるが、基質骨格に光反応性基と検出・単離に必要なタグを導入する必要がある。放射性同位体を利用する手法は、基本骨格の修飾も最小限にとどめる事ができるため古くから用いられてきたが、制限のある区域での超微量な放射性試薬の使用による合成収率の低下等の問題があった。[1] 近年、質量分析計の進歩は、放射性同位体と比較して質的にも量的にも扱いやすい安定同位体を生理活性機能解析へ利用する道を開いた。我々はアミノ酸骨格を持つ誘導体へのフリーデルークラフト反応を検討する中で、トリフルオロメタンスルホン酸(TfOH)が有用であり[2]、その反応機構解析において重水素化した TfOH による芳香族環の水素−重水素 (H/D)交換反応が進行する事を見出し、芳香族アミノ酸単体のみならずペプチド内に含まれる芳香族アミノ酸に対しても制御可能な交換反応が進行する事を明らかとした。[3] この手法をクロスリンク可能な芳香族アミノ酸誘導体に利用した所、カテコール構造を持つ DOPA において効率的な水素−重水素交換を達成した。光反応性基を持つ芳香族アミノ酸誘導体において、アジド置換 Phe 誘導体では酸性条件下における不安定性のため、ベンゾフェノン置換 Phe 誘導体においてはカルボニル基による芳香環の不活性化のため H/D 交換反応はほとんど進行しなかった。ジアジリン置換 Phe 誘導体は 40%程度の交換が観察された。H/D 交換を促進するため、N−末を保護することで 70%程度の交換が観察された。[4] ジアジリン誘導体においてより高い重水素導入を達成するため、これまでのジアジリン芳香族環とアミノ酸骨格の縮合による Phe 誘導体の構築法[5] を見直し、これまで行なわれていない Phe 上に光反応性基ジアジリンを構築する反応経路を検討した。N−末を Boc、C−末を tBu で保護したヨウ素化 Phe に対し $CF_3CO$ 化、それに続く oxime 化、tosyl 化を経て、新たに発見した液体アンモニアによる長時間処理により一段階でのジアジリン構築を達成した。この反応活性種がアミドアニオンであると予想し、液体アンモニアの長時間処理に代わり、リチウムアミドを共存させる事によって短時間でジアジリン構築も可能である事もあわせて見出したが、アミノ酸骨格に適用した場合ラセミ化が観察された。この合成法を重水素化フェニルアラニンに適用する事で、目的とする芳香環が高度に重水素標識された光学活性ジアジリン化 Phe 誘導体の合成に成功した。[6]

参 考 文 献 1)Eur. J. Org. Chem., 2513(2008), 2)Tetrahedron Lett., 49, 6566(2008), Tetrahedron, 67, 641(2011), BBB, 75, 352(2011), 3)Eur. J. Org. Chem., 5111(2013), 4)BBB, 78, 1129(2014), 5)J. Am. Chem. Soc., 128, 15092(2006), Bioorg. Med. Chem. Lett., 20, 1081(2010), 6)Org. Lett., 17, 616(2015).

photoaffinity label, hydrogen-deuterium exchange, diazirine

発表責任者：橋本　誠（hasimoto@abs.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：3C14a06
講演日時：3 月 19 日 10:45～ C 校舎 14 会場

過酸化水素；オビヤスデ目ヤスデの新規防御物質
Hydrogen peroxide; a new defensive compound of polydesmid millipedes
○桑原 保正[1]、山口 拓也[2]、市来 弥生[3]、田辺 力[4]、浅野 泰久[1]([1]富山県大・生工科・生工研セ, JST, ERATO、[2]筑波大・生命環境、[3]宮崎県農総試・食の安全分析セ、[4]熊本大・教育)
○Yasumasa Kuwahara[1], Takuya Yamaguchi[2], Yayoi Ichiki[3], Tsutomu Tanabe[4], Yasuhisa Asano[1] ([1]Toyama Pref. Univ., Biotech. Res. Center & Dept. Biotech., JST, ERATO, [2]Univ. Tsukuba., Life & Environ. Sci., [3]Miyazaki Agr. Res. Center, [4]Kumamoto Univ. Educ.)

〔目的〕オビヤスデ目 Polydesmida には、ヒドロキシニトリル・リアーゼ（HNL）が働き、主成分マンデロニトリル(MN)を青酸（HCN）とベンズアルデヒド（Bz−al）に分解しながら防御物質とする種（A 群）と、さらにマンデロニトリル酸化酵素(MOX)が加わり、ベンゾイルシアニド（Bz−CN）を産生し、続く諸反応により発生する HCN、安息香酸（Bz−acid）、マンデロニトリルベンゾエート（MN−Bz）、ベンジルアルコール(Bz-OH)の 7 成分を防御物質とする種（B 群）に、大別できる。MOX はフラビン酵素であり、過酸化水素（$H_2O_2$）を副生するが、その $H_2O_2$ を防御物質として体外に分泌しているとの知見はない。そこで体外への $H_2O_2$ 分泌の有無を、A、B 群を比較して調べた。
〔材料及び方法〕$H_2O_2$ の検出と定量には Trinder 試薬[4-aminoantipyrine, *N*-ethyl-*N*-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3-methylaniline Na 塩 及び peroxidase の混合物による発色法]による比色法（555 nm）を用い、HCN はアルカリ性ピクリン酸紙の呈色反応により検出した。A 群ヤスデのアマビコヤスデ *Riukiaria semicircularis semicircularis* と、B 群ヤスデのヤンバルトサカヤスデ *Chamberlinius hualienensis* とヒラタババヤスデ *Parafontaria falcifera* から、それぞれの防御分泌液を濾紙に捕集した。まず Trinder 試薬を噴霧して $H_2O_2$ の検出を試み、続いてその上にピクリン酸紙を重ねて HCN の検出を試みた。また B 群のヒラタババヤスデとキシャヤスデ *P. laminata* をそれぞれヘキサンに浸漬（3 分間）し、ヘキサン層の Bz−CN は GC/MS 分析により、虫体残渣中 $H_2O_2$ は Trinder 試薬で比色定量し，両結果の相関を調べた。さらにヤスデ 9 種に Trinder 試薬を加え、$H_2O_2$ の存在を調べた。
〔結果及び考察〕A 群のアマビコヤスデには MOX がなく、防御分泌物は Trinder 試薬に陰性で、ピクリン酸紙により HCN 存在のみを確認した。一方 B 群のヤンバルトサカヤスデとヒラタババヤスデでは両発色法共に陽性で、防御分泌液中の $H_2O_2$ と HCN の存在を証明できた。また GC/MS による Bz−CN の定量値と Trinder 試薬による $H_2O_2$ の定量値の間に、正の相関関係を認めた。分泌物組成から A 群と B 群に分類できるヤスデ 9 種を Trinder 試薬で調べた結果、B 群はすべて陽性で $H_2O_2$ を分泌する種であること、A 群及びその他のベンゾイルシアニド（Bz−CN）を分泌しないヤスデでは陰性で、$H_2O_2$ を分泌しない種と判った。現在防御物質組成を調べられたオビヤスデ目ヤスデは不完全な同定を含めて世界中で 48 種あり、そのうち 23 種が $H_2O_2$ を分泌するヤスデと結論できた。ムカデにも、HCN と Bz−CN を分泌する種が知られており、調べたベニジムカデ *Strigamia* sp.にも HCN と $H_2O_2$ の分泌を認めた。

hydrogen peroxide detection from millipedes, Polydesmida; hydrogen peroxide emitter, new defensive compound of millipedes

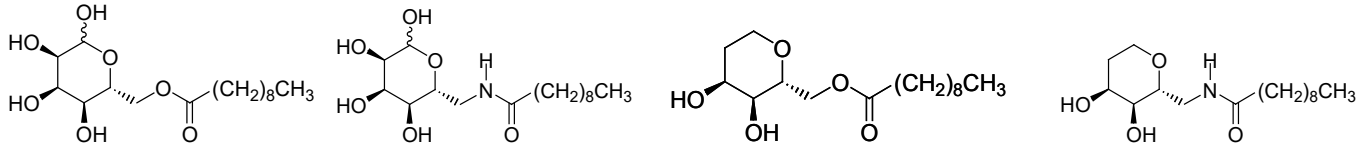
発表責任者：桑原保正（kuwahara@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：3C14a07
講演日時：3 月 19 日 11:00～ C 校舎 14 会場

# Retarding activity of 6-(decanoylamino)-1,2,6-trideoxy-D-allose on plant growth

○Md Tazul Islam Chowdhury[1], Hikaru Ando[2], Ryo C. Yanagita[2], Yasuhiro Kawanami[2] ([1]Ehime Univ., [2]Kagawa Univ.)

D-Allose, a naturally-occuring rare monosaccharide, is a C-3 epimer of D-glucose that displays various biological activities such as anti-proliferative effect against cancer cells, immunosuppressive effect, and inhibitory effect on plant growth. Our group recently found that 6-*O*-octanoyl-D-alloses showed six times greater inhibitory activity on plant growth than D-.[1] In addition, we described the effect of the length of the acyl group on rice growth-retarding activity[2] and the structure-activity relationship of the hudroxy group at C-1 and C-2.[3] In this study, we synthesized new rare sugar derivatives containing amino group, 6-decanoylamino-1,2,6-trideoxy-D-allose (dAll-NC10) and evaluated its biological activities on plant growth.



All-C10　　All-NC10　　dAll-C10　　dAll-NC10

First, 6-amino-1,2-dideoxy-D-allose (dAll-$NH_2$) was synthesized from 1,2-dideoxy-D-allose by three step reactions: regioselective tosylation (TsCl, Py), azidation ($NaN_3$, DMF) and catalytic hydrogenation ($H_2$, Pd-C, EtOH). Finally acylation of dAll-$NH_2$ with decanoyl chloride afforded dAll-NC10. Then bioassays were performed using lettuce (*Lactuca sativa*) seedlings for two days in dark. Comparing the $IC_{50}$ value of dAll-NC10 with that of 6-decanoylamino-D-allose (All-NC10), dAll-NC10 showed twice higher inhibitory activity than All-NC10. dAll-NC10 showed higher inhibitory activity than dAll-C10 on both shoot and root of lettuce seedlings. These findings indicate that the amino group at C-6 of deoxy allose increased the inhibitory activity on plant growth.

1) Afach, G., et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **2006**, *70*. 2010-2012.
2) Kobayashi, M., et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **2010**, *74*. 216-217.
3) Chowdhury, Md. T. I., et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **2016**, *80*. 676-681.

D-allose, Plant growth, Retarding activity

発表責任者：Md. Tazul Islam Chowdhury（mticsau@yahoo.com）

講演番号：3C14a08
講演日時：3 月 19 日 11:15～ C 校舎 14 会場

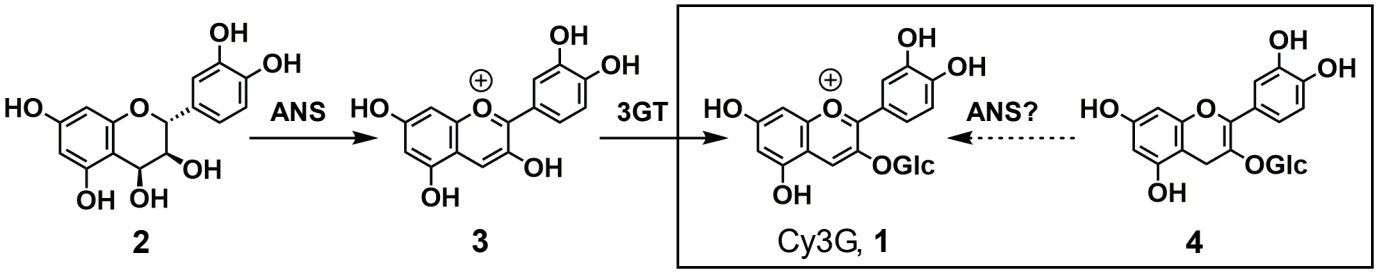
# 黒大豆種皮色素シアニジン 3-グルコシドへのフラブ-2-エン-3-オール 3-グルコシドの変換反応に関する研究

# Study on conversion reaction of flav-2-en-3-ol 3-glucoside to cyanidin 3-glucoside in black soybean seed coat

○中根 悠輔、TEPPABUT Yada、林 英美、近藤 忠雄、吉田 久美（名大院情報科学）
○Yuhsuke NAKANE, Yada TEPPABUT, Emi HAYASHI, Kumi KONDO, Kumi YOSHIDA (Grad. Sch. info. Sci., Nagoya Univ.)

【目的】黒大豆 (*Glycine max*) の種皮色素シアニジン 3-グルコシド (Cy3G, **1**)の生合成では、シスロイコ体 (**2**) が酸化されてシアニジン (**3**) となった後、配糖化されると考えられてきた [1)]。ところが、深見らにより未熟種皮に配糖化フラベノール (**4**) が含まれ、酸性溶液中で容易に **1** へ変換されることが報告された [2)]。我々も独自に未熟種皮に **4** の存在を確認し、黒大豆の未熟種子を莢から取り出して空気に曝露すると数時間で黒化して **1** が生成することを見出した [3)]。これらは **1** が **2** ではなく **4** を経由して生合成されることを示唆する。この解明を目的に、未熟種子中の **1** と **4** の黒化に伴う増減を調べた。さらに、酸化機構を明らかにするため、粗酵素液の調製と遺伝子クローニングを行い、酵素反応を行ったところ、**1** が **4** を経由して生成されることを支持する結果を得た。

【方法と結果】黒大豆 (*G. max* cv. Iwaiguro) を 2015 年及び 2016 年に名古屋大学圃場で栽培し、未熟種子を採取した。採取した種子は種皮色により薄緑色（ステージ 1)、淡赤色 (ステージ 2)、紫色（ステージ 3）に分類し、50%アセトニトリル水溶液で抽出して HPLC で分析した。ステージ 2, 3 の種子には **4** が存在した。さらに未熟種子を空気に曝露したところ、ステージ 2, 3 でのみ黒化が進行した。空気曝露により黒化した種子では **1** の増加と **4** の減少が連動していることが分かった。**4** から **1** への酸化反応に酵素が関与するか否かを明らかにするため、化学合成した **4** と未熟種皮より調製した粗酵素液を反応させた。粗酵素存在下で **4** は短時間で **1** に変換された。現在、未熟種皮より *ANS* 遺伝子をクローニングし、タンパク質の発現を進めている。




スキーム 1　これまで考えられてきた **1** の生合成経路 [1)]（左）と今回提案する新経路（右）.

1) W. Hellar, G. Forkmann, The Flavonoids Advances in Research since 1986, **1994**, pp. 499-514.
2) Fukami, H. et al., *J. Oleo Sci.,* **2013**.
3) 林英美ら, 日本農芸化学会 2015 年度大会講演要旨集（岡山）**2015.**

*Gricine max*, flav-2-en-3-ol 3-glucoside, cyanidin 3-glucoside

講演番号：3C14a09
講演日時：3 月 19 日 11:30～ C 校舎 14 会場

# ガロイル化フラバン-3-オール誘導体の合成と構造-活性相関研究

# Synthesis and SAR studies of galloyl-modified flavan-3-ol derivatives

○法島 太一[1]、米田 慎吾[1]、中島 範行[2]、齊藤 安貴子[1] ([1]大阪電通大院工、[2]富山県立大工)
○Taichi Hojima[1], Shingo Komeda[1], Noriyuki Nakajima[2], Akiko Saito[1] ([1]Graduate School of Engineering, Osaka Electro-Communication University (OECU), [2]Biotechnology Research Center and Department of Biotechnology, Toyama Prefectural University)

【目的】

フラバン-3-オール類は、様々な生物活性を有するポリフェノール化合物として知られている。緑茶カテキンとして知られているエピガロカテキンガレート (EGCG)(**1**)もその一種であり、強い抗酸化活性や、ガン細胞選択的増殖阻害活性等、様々な生物活性を持つ。我々は、フラバン-3-オールの構造-活性相関に興味を持ち、位置選択的修飾法の開発、及び、生物活性測定を進めてきた。これまでに 5 位、及び、7 位選択的脱保護法を見出し、5、7 位にガロイル基を導入したフラバン-3-オール類（**2**、**3**、**4**、**5**、 Figure1 参照） の選択的合成に成功した。これらを用いて各種生物活性試験を行ったところ、2,3-*cis* 型 **2** が HeLa S3 細胞（ヒト子宮頸ガン細胞）に対して極めて強い増殖阻害活性を持つ一方で、2,3-*trans* 型 **5** は活性を持たなかった。[1] さらに、B 環上に水酸基を 3 つ持つエピガロカテキン誘導体 **3** の活性が高く、7 位へのガロイル基の導入が活性には大きく関与しなかった。これらをふまえ本発表では、さらに活性が高いと予想されたエピガロカテキン誘導体 **6** の合成研究と活性評価を行ったので報告する。

【方法と結果】

各種フラバン-3-オールを出発原料とし、数工程を経てガロイル化フラバン-3-オール誘導体を合成し、HeLa S3 細胞を用いた活性評価を行った。その結果の一部を Figure 1 に示した。化合物 **6** の活性が予想と異なり低いことが明らかになった。現在さらなる合成研究と活性評価を進めており、それらをまとめて報告する。

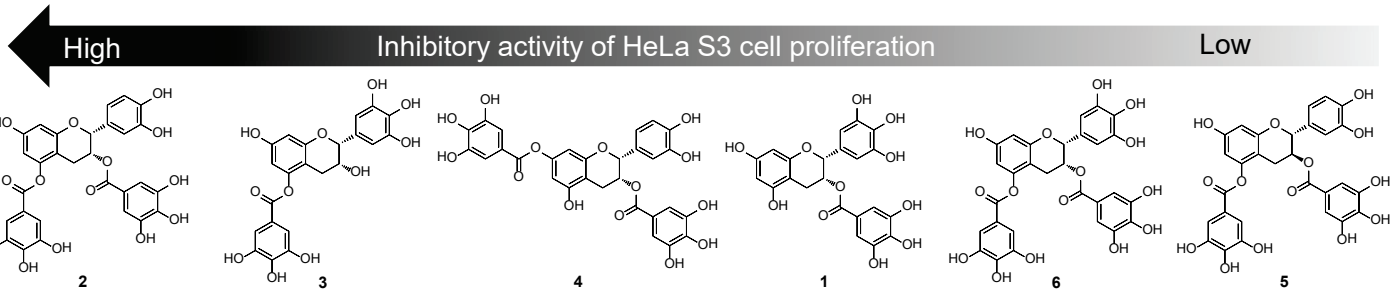



**Figure 1**. Structure of galloyl-modified flavan-3-ol derivatives and inhibitory activity of HeLa S3 cell proliferation

1) K. Mori, *et al*. *Nat. Prod. Chem. Res*., **3**, 172 (2015).

flavan-3-ol derivatives, structure-activity-relationships, regioselective synthesis

発表責任者：齊藤安貴子（a-saito@osakac.ac.jp）

講演番号：3C14p01
講演日時：3 月 19 日 14:00～ C 校舎 14 会場

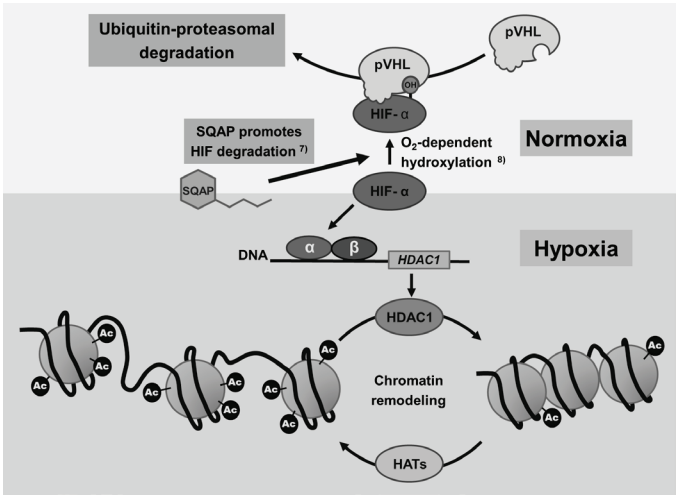
# 放射線増感作用を持つ化合物 SQAP は HDAC1 の発現を抑制する
# Radiosensitizing agent SQAP suppresses HDAC1 expression

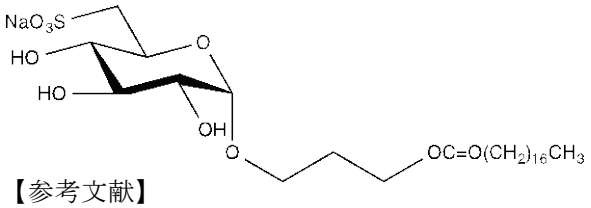
○川久保 悠史[1]、カルボネル ヘスス[1]、紙透 伸治[2]、佐原 弘益[2]、倉持 幸司[1]、菅原 二三男[1] ([1]東理大・理工、[2]麻布大・獣医)
○Hirofumi KAWAKUBO[1], Jesus CARBONELL[1], Shinji KAMISUKI[2], Hiroeki SAHARA[2], Kouji KURAMOCHI[1], Fumio SUGAWARA[1] ([1]Faculty of Sci. & Technol., Tokyo Univ. of Sci., [2]Vet. Med., Azabu Univ.)

Sulfoquinovosylacylpropanediol (SQAP) は放射線増感作用を有している[1)]。実際に前立腺由来のがん細胞を移植したマウスに対して、放射線との併用による治療効果が確認されており[2)]、新規放射線増感薬としての利用が期待されている。その作用機構は多岐に渡り、未解明の部分が多い。そこで本研究では、SQAP の放射線増感作用の分子メカニズムを明らかにすることを目標とした。

SQAP と同様の活性を持つ類縁体 SQMG の投与によって、複数の遺伝子発現量が変化することが示唆されている[3)]。本研究ではヒストン脱アセチル化酵素 1 (HDAC1) に着目した。HDAC の阻害は、DNA 修復などの阻害やクロマチン構造の弛緩を引き起こすことが知られている[4), 5)]。そこで我々は SQAP が HDAC1 の発現を阻害し、DNA 修復の抑制やクロマチン構造の弛緩を引き起こし、DNA の放射線感受性を高めることで放射線増感作用を示すと考えた。

前回本大会において、低酸素条件における肝臓がん由来 HuH-7 細胞において、SQAP 処理により HDAC1 のタンパク質量が減少することを報告した[6)]。今回 Real-time RT PCR から、SQAP 濃度依存的に HDAC1 の mRNA 量が減少することを見出した。これらの結果より、SQAP が HDAC1 の発現を抑制することが示唆された。また低酸素条件においてのみこれらの現象が観察されること、SQAP によって低酸素誘導因子 HIF-1α の分解が誘導される報告[7)]から、HIF-1α がこの現象に関与していると予想した。薬剤処理時間等の検討により、SQAP 投与により HIF-1α の減少が誘導され、それにより HDAC1 の転写が抑制され、HDAC1 発現量の減少につながるということが示唆された。




【参考文献】
[1)] Ohta, K. *et al.* JP 4435861.
[2)] Sawada, Y. *et al. Int. J. Urol.*, **2015**, *22*, 590-595.
[3)] Matsuki, K. *et al. Cancer Sci.*, **2012**, *103*, 1546-1552.
[4)] Xu, W. S. *et al. Oncogene* **2007**, *26*, 5541-5552.
[5)] Camphausen, K. *et al. J. Clin. Oncol*. **2007**, *25*, 4051-4056.
[6)] 日本農芸化学会 2016 年度 札幌大会
[7)] Iwamoto, H. *et al. Mol. Ther. Oncolytics*, **2015**, *2*, 15020.
[8)] Wenger, R. H. *et al. FASEB J*. **2002**, *16*, 1151-1162.

Sulfoquinovosylacylpropanediol, Hdac1, Hif-1α

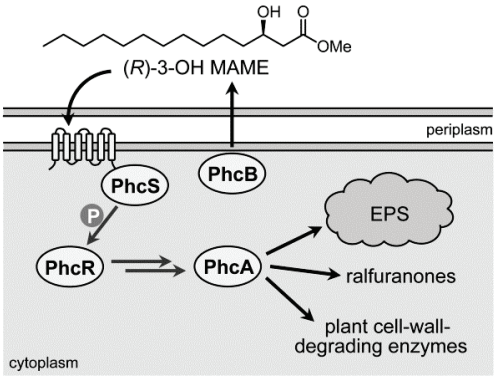
講演番号：3C14p02
講演日時：3 月 19 日 14:15～ C 校舎 14 会場

# 青枯病菌クオラムセンシングシグナル分子はヒスチジンキナーゼ PhcS の膜貫通ドメインに受容される

# Binding of methyl 3-hydroxymyristate, a quorum sensing signal of *Ralstonia solanacearum*, to the trans-membrane domain of the histidine kinase PhcS

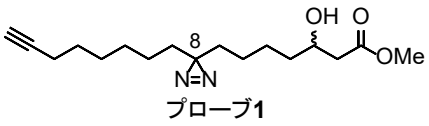
○嶋谷 美香[1]、木場 章範[2]、大西 浩平[3]、曳地 康史[2]、甲斐 建次[1] ([1]阪府大院・生命環境、[2]高知大・農、[3]高知大・総研セ)
○Mika SHIMATANI[1], Akinori KIBA[2], Kouhei OHNISHI[3], Yasufumi HIKICHI[2], Kenji KAI[1] ([1]Osaka Prefecture Univ., [2]Kochi Univ., [3]Kochi Univ. SRC)

**【目的】**青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* は，200 以上の植物種に感染するグラム陰性細菌である。本菌は根の傷などから宿主に侵入し，維管束内で爆発的に増殖する。この際，大量の細胞外多糖（EPS）を産生することで維管束の通水を阻害し，植物を萎凋させる。EPS などの病原力因子の産生は，グローバルビルレンスレギュレーターPhcA によって制御されており，PhcA の活性はクオラムセンシング（QS）によって調節されている（右図）。我々は，本 QS 系を制御するシグナル分子が (*R*)-methyl 3-hydroxymyristate（3-OH MAME）であることを明らかにした。




変異株の解析から，3-OH MAME は 6 回膜貫通ヒスチジンキナーゼ PhcS によって受容されることが予想されているが，それらの結合を直接的に証明するデータはない。そこで本研究では，フォトアフィニティープローブを用いて 3-OH MAME と PhcS 受容体の結合を証明することを試みた。

**【方法・結果】**3-OH MAME の構造活性相関研究から得られた知見に基づき，3-OH MAME と受容体タンパク質の結合を検出するフォトアフィニティープローブをデザインした。受容体との結合への影響を小さくするために，フォトアフィニティー基には構造変化の小さいジアジリン基を選択し，アシル鎖末端にはクリック反応により検出基を結合させるためにアルキン基を導入することにした。ジアジリン基の最適な導入位置を検討するために，導入位置の異なる 3 種類のプローブを有機合成し，QS シグナル活性を評価した。その結果，8 位にジアジリン基を導入したプローブ **1** が最も強い活性を示したため，プローブ **1** を用いて受容体タンパク質との結合実験を行うことにした。推定受容体 PhcS の膜貫通ドメインを大腸菌で発現し，調製した膜画分に対してプローブ **1** を処理した。インキュベーション後の膜画分に 365 nm の UV を照射し，続いて DDM による可溶化・TAMRA-azide とのクリック反応を行った。反応後の膜画分を SDS-PAGE に供し，蛍光撮影装置でゲルを観察したところ，PhcS 膜貫通ドメインのバンドに TAMRA 由来の蛍光が観察され，プローブ **1** が PhcS に結合することが強く示唆された。現在，本結合の特異性を競合試験で検証しつつ，プローブ結合位置の同定を計画している。



プローブ1

*Ralstonia solanacearum*, quorum sensing, photoaffinity probe

発表責任者：甲斐建次（kai@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：3C14p03
講演日時：3 月 19 日 14:30～ C 校舎 14 会場

PPM1 活性化物質は成熟脂肪細胞における脂肪滴の蓄積を抑制する
Suppression of Fat Accumulation by PPM1 Activators in 3T3-L1 Adipocytes.
○鵜飼 容子[1]、佐竹 一紘[1]、中川 大[1]、木村 賢一[2]、大西 素子[1] ([1]中部大学大学院応用生物学研究科、[2]岩手大・農)
○Yoko UKAI[1], Kazuhiro SATAKE[1], Hiroshi NAKAGAWA[1], Ken-ichi Kimura[2], Motoko OHNISHI[1] ([1]Graduate school of Bioscience and Biotechnology, Chubu Univ., [2]Fac. of Agri., Iwate Univ.)

【目的】生体内において脂肪細胞数の増加や脂肪細胞の肥大化によって引き起こされる肥満は、2 型糖尿病やがん、炎症性疾患などの発症リスクを高めることが知られている。脂肪細胞は前駆脂肪細胞が小型脂肪細胞に分化し、生体内のエネルギー代謝に応じて、肥大化脂肪細胞へと分化が進んでいく。一方、プロテインホスファターゼ PPM1A および PPM1B はエネルギー代謝の調節に関与することが報告されている。我々はこれまでに glabridin が PPM1A および PPM1B 活性化物質であることを同定し、glabridin が PPM1B を介して破骨細胞分化を抑制することを明らかにしてきた。近年、glabridin は白色脂肪細胞における脂肪滴の小型化を促進し、マウスの筋肉、肝臓における脂質合成遺伝子の発現を抑制することが報告された。さらに PPM1A を活性化する lambertianic acid も、脂肪組織において脂肪滴の蓄積を抑制することが明らかとなった。そこで本研究では、PPM1 の活性化物質が脂肪細胞の肥大化抑制効果を持つかどうかを明らかにするために、先に PPM1 活性化物質であることを同定した pisiferdiol を用いて、脂肪滴の蓄積に対する効果を検討したので報告する。
【方法】PPM1A および PPM1B と glabridin および pisiferdiol とのドッキングシュミレーションは、Molegro Virtual Docker を用いて行った。マウス繊維芽細胞 3T3-L1 は 24well plate に $1\times10^5$ cells/well で播種し、10 % FBS を含む DMEM で培養を行った。コンフルエントに達した後、5 μg/ml insulin、500 μM IBMX、250 nM DEX を加えて分化誘導を開始した。2 日間培養後、5 μg/ml insulin を含む培地で培地交換を行った。さらに 2 日後、insulin を含まない培地に交換し、2 日ごとに培地交換しながら 4 日間培養し、成熟脂肪細胞を得た。この成熟脂肪細胞に化合物を様々な濃度で添加し、さらに 4 日間培養した後オイルレッド O 染色を行い、細胞内脂肪滴を染色した。染色後、オイルレッド O を 2-propanol で抽出し、510 nm で比色定量を行った。
【結果】ドッキングスタディの結果、PPM1A に対しては glabridin も pisiferdiol も Arg124 近傍のほぼ同じ部位に結合する可能性が高いことが示された。また、PPM1A と PPM1B は 70%以上のアミノ酸配列の相同性を有するにも関わらず、化合物の結合部位は異なる可能性が示唆された。成熟脂肪細胞に対する pisiferdiol の効果を検討した結果、glabridin と同様に濃度依存的に成熟脂肪細胞に蓄積した脂肪滴の量を減少させることが明らかとなった。

adipocytes, protein phosphatase

発表責任者：大西　素子（mohnishi@isc.chubu.ac.jp）

講演番号：3C14p04
講演日時：3 月 19 日 14:45～ C 校舎 14 会場

植物由来の生物活性ジテルペン化合物モミラクトンが酵母に与える生育抑制効果
Diterpenoid Momilactones, Bioactive Substances in Plants, Function as Potent Inhibitors for Yeast Growth.
○富田 啓介[1]、松尾 安浩[2]、川向 誠[2]、野尻 秀昭[1]、岡田 憲典[1]([1]東大・生物工学セ、[2]島根大・生物資源)
○Keisuke TOMITA[1], Yasuhiro MATSUO[2], Makoto KAWAMUKAI[2], Hideaki NOJIRI[1], Kazunori OKADA[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Shimane Univ.)

【背景・目的】

モミラクトンは育種型イネ *Oryza sativa* や数種の野生イネ，及び蘚類ハイゴケ *Hypnum plumaeforme* により生産される抗菌性化合物であり，モミラクトン A とモミラクトン B が知られている．モミラクトンは真菌や細菌の生育を阻害するだけでなく，他の植物の生育を阻害するアレロパシー物質としての効果を持つことから，モミラクトン生産植物は病原菌の感染防御や，他の植物との生存競争にこの生物活性物質を利用していると考えられる．さらに近年，モミラクトン B がヒト癌細胞に対しても抗腫瘍活性を持つことやアポトーシスを誘導することが報告され，モミラクトンが幅広い生物種に対する作用スペクトルを持つことが示唆されている．しかしながら，モミラクトンがこれら様々な生物の生育を阻害する詳細な作用メカニズムについては明らかにされていない．そこで本研究では，モミラクトンの作用メカニズム解明を目的として，これまでにモミラクトンの効果について報告のない，酵母菌に対するモミラクトンの生育抑制作用について検討した．

【方法・結果】

まず，出芽酵母と分裂酵母に対するモミラクトンの生育阻害効果を調べた．両酵母に対して 0～10 μM の濃度域でモミラクトンを添加した YPD 若しくは YES 液体/固体培地での生育を調べたところ，モミラクトン A よりもモミラクトン B の方が生育阻害活性が高いこと，出芽酵母よりも分裂酵母の方がモミラクトンに対する感受性が高いことがわかった．また，モミラクトン添加培地中で培養した後の分裂酵母をモミラクトン非添加培地に移し酵母の生残性を調べたところ，再び生育することが確認され，モミラクトンにより分裂酵母の viability は失われないこともわかった．更に，モミラクトン処理後の分裂酵母の細胞周期をフローサイトメトリーにより解析したところ，細胞内の DNA 含量が倍加する傾向が見られた．また，モミラクトン処理時の分裂酵母を顕微鏡観察したところ，多くの細胞でマルチセプタムの形成が確認された．これらの一連の現象は，モミラクトンが分裂酵母の細胞周期の進行を攪乱することでその生育を阻害しており，その結果，細胞分裂が正常に進まなくなっていることを示唆している．今後は，モミラクトンの作用標的を探索するため，分裂酵母の遺伝子破壊株ライブラリーを対象としてモミラクトンに対する感受性が変化した株をスクリーニングし，この現象に関わる遺伝子の取得を進める予定である．

antibiotics, terpenoid, yeast

講演番号：3C14p05
講演日時：3 月 19 日 15:00～ C 校舎 14 会場

dioctatin による Clp プロテアーゼ機能異常を介したアフラトキシン生産阻害機構
Molecular mechanism of dioctatin for inhibiting aflatoxin production via functional disorder of Clp protease

○古川 智宏[1]、片山 秀和[2]、市川 琢万[2]、飯村 九林[1]、山本 利義[1]、根岸 瑠美[3]、鈴木 道生[1]、作田 庄平[1] ([1]東大院・農生科・応生化、[2]東海大・工・生化、[3]東大・分生研)
○ Tomohiro FURUKAWA[1], Hidekazu KATAYAMA[2], Takuma ICHIKAWA[2], Kurin IIMURA[1], Toshiyoshi YAMAMOTO[1], Lumi NEGISHI[3], Michio SUZUKI[1], Shohei SAKUDA[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Tokai Univ., [3]The Univ. of Tokyo IMCB)

【目的】*Aspergillus* 属の生産するアフラトキシン (AF)による農作物の汚染は世界的に深刻な問題であり、AF 汚染を制御する効果的な防除法の開発が望まれている。当研究室では、早期耐性菌蔓延の懸念が少ない特異的 AF 生産阻害物質による防除法に着目し、AF 生産阻害物質に関する研究を行っている。これまでに、*Streptomyces* sp. SA-2581 の生産する dioctatin A が、$IC_{50}$ 4.0 μM で *Aspergillus parasiticus* の AF 生産を阻害し、AF 生産関連遺伝子の転写量の減少を引き起こすことを報告した。dioctatin A はヒトジペプチジルペプチダーゼ (DPP) II の阻害剤として知られるが、AF 生産菌には DPP II と配列類似性の高いタンパク質をコードする遺伝子は存在しない。dioctatin のような AF 生産阻害物質の作用機序の解明は、AF 生産分子機構のより深い理解と、効果的な AF 防除法の開発に貢献できると考えられる。そこで本研究では、dioctatin の AF 生産阻害機構の解明を目指した。
【方法および結果】エチニル基を導入した dioctatin 誘導体とアジド基をもつナノビーズを反応させ、dioctatin 固定化ビーズを調製した。dioctatin が AF 生産阻害活性を示し、ゲノムが判明している *Aspergillus flavus* の抽出タンパク質に対し、dioctatin 固定化ビーズによる精製を行ったところ、SDS-PAGE 上で 27 kDa 付近にビーズに結合し dioctatin で溶出されるバンドが確認された。LC/MS/MS 解析の結果、バンドのタンパク質としてミトコンドリア内に局在する Clp プロテアーゼの触媒サブユニット (ClpP) が同定された。調製した組換え ClpP (rClpP) が dioctatin 固定化ビーズに結合し dioctatin により特異的に溶出されることを確認した。蛍光ペプチドあるいはカゼインを基質として rClpP の活性を評価したところ、dioctatin は rClpP による蛍光ペプチドの分解には大きな影響を与えない一方、カゼインの分解を強く促進することが明らかとなり、dioctatin は ClpP の立体構造に影響を与えることが示唆された。ミトコンドリアタンパク質の蛍光ディファレンスゲル二次元電気泳動解析から、dioctatin は ClpP による特定のタンパク質群の分解を促進することが示唆された。また、dioctatin により *A. flavus* 培養上清中の AF 量が減少するとともにエタノール量が増加し、解糖系およびエタノール発酵に関連する遺伝子の発現量が増加することがわかった。以上から、dioctatin は ClpP の活性の異常増幅によりミトコンドリアタンパク質の分解・機能異常を招き、細胞内栄養状態を変化させ、AF 生産量の減少と解糖・エタノール発酵系へのエスケープを引き起こすと考えられた。
【謝辞】本研究は農林水産省委託プロジェクト研究「カビ毒の動態解明と産生低減技術の開発(カビ毒動態)」として行われているものである。

Target identification, *Aspergillus flavus*, Clp protease

発表責任者：古川智宏（tomohiro-furukawa775@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3C14p06
講演日時：3 月 19 日 15:25～ C 校舎 14 会場

# クルクミンが出芽酵母の薬剤排出およびその関連遺伝子の発現に与える影響

# Effects of curcumin on multi-drug efflux and expression of its related genes in *S. cerevisiae*

○山脇 千佳[1]、山口 良弘[1,2]、荻田 亮[1,3]、田中 俊雄[1]、藤田 憲一[1] ([1]阪市大院・理、[2]阪市大・複合先端、[3]阪市大・健康研セ)
○Chika YAMAWAKI[1], Yoshihiro YAMAGUCHI[1,2], Akira OGITA[1,3], Toshio TANAKA[1], Ken-ichi FUJITA[1] ([1]Grad. Sch. Sci., Osaka City Univ., [2]OCARINA, Osaka City Univ., [3]Res. Center Urban Health & Sports, Osaka City Univ.)

ウコンの根茎に含まれるクルクミンは脂溶性のポリフェノールで、*in vitro* において抗アミロイドβ凝集抑制や抗酸化、抗がん、脂質代謝改善など多くの生理活性を示す可能性が報告されている。しかしながら、微生物に対する活性についてはほとんど報告がなされていない。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* をクルクミンで単独処理した場合、その生育にはほとんど影響が見られなかったが、一過性の殺菌作用を示すドデカノールとクルクミンとを組み合わせた場合、相乗的な抗真菌作用を発揮することが明らかになった。本研究では、クルクミンとドデカノールによる相乗的抗真菌作用のメカニズムを解明することを目的とした。

クルクミンと構造・物性が類似する物質群としてアニスオイルの主成分であるアネトールなどのフェニルプロパノイド類が挙げられる。この物質は他の薬剤と併用した場合、薬剤排出ポンプの遺伝子発現を抑制することによって出芽酵母に対して相乗的抗真菌作用を示すことが先行研究で明らかとなっている。そこで本研究においてもクルクミンとドデカノールによる相乗的抗真菌作用に薬剤排出ポンプが関与していると想定し、研究を進めた。

クルクミンの薬剤排出ポンプへ及ぼす影響については、薬剤排出ポンプによって細胞外へと排出される蛍光物質 Rhodamine 6G を用いて調べた。クルクミンと蛍光物質 Rhodamine6G が共存する場合、クエンチングによる蛍光の消光が問題となるため、両者を逆相カラムを用いる HPLC により分離し、細胞外へ排出される Rhodamine6G を定量した。その結果、クルクミンは薬剤排出ポンプの活性を抑制していることがわかった。さらに、クルクミンが薬剤排出ポンプの遺伝子発現に影響するか検討した。多剤耐性に関わる薬剤排出ポンプ PDR5 の発現量を RT-PCR 法を用いて調べた。その結果、ドデカノール処理することで PDR5 の発現量が増大するが、クルクミンを併用させるとその発現量が大幅に低下することがわかった。

以上の結果より、クルクミンは出芽酵母の薬剤排出を抑制することでドデカノールの菌体外への排出を抑制し、相乗的抗真菌作用を示すことが示唆された。

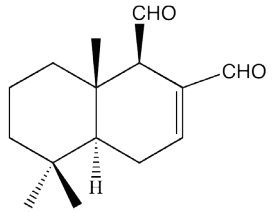
curcumin, multi-drug resistance, antifungal

講演番号：3C14p07
講演日時：3 月 19 日 15:40～ C 校舎 14 会場

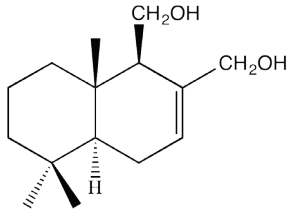
polygodial の殺真菌活性におけるアルデヒド基の役割
Role of aldehyde group in fungicidal activity of polygodial

○高落 裕介[1]、荻田 亮[1,2]、亀田 宗矢[1]、臼杵 克之介[1]、藤田 憲一[1]、田中 俊雄[1] ([1]阪市大院・理、[2]阪市大・健康研セ)
○ Yusuke TAKAOCHI[1], Akira OGITA[1,2], Soshi KAMEDA[1], Yoshinosuke USUKI[1], Ken-ichi FUJITA[1], Toshio TANAKA[1] ([1]Osaka City Univ, [2]Res. Center Urban Health & Sports, Osaka City Univ)

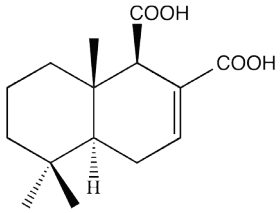
【目的】殺真菌機序の 1 つとみなされている「液胞膜破壊作用」は, ポリオールマクロライド抗生物質である niphimycin に認められて以降, amphotericin B , さらには細菌の細胞膜障害剤として知られる polymyxin B にも見いだされている. 真菌の「液胞膜破壊作用」を発揮する新たな成分を探索した結果, 植物由来成分としては初めてヤナギタデの辛み成分として知られる polygodial を見いだした.[1)] しかしながら, 高濃度の polygodial 処理細胞においては、活性酸素種（ROS）産生に関連する細胞膜障害作用も惹起されるなど, 本セスキテルペン類が発揮する複合的作用の相互関係は不明のままである. 本研究においては, polygodial の「液胞膜破壊作用」にとって必須の構造を特定することを目的として, polygodial 誘導体を対象とする検討を行った.



polygodial



drimendiol



dicarboxyl derivative

【方法】水素化ホウ素ナトリウムを用いる還元および TEMPO 酸化によって polygodial の 2 つアルデヒド基の還元および酸化を行った. 真菌モデル細胞としての *S. cerevisiae* の培養は 2.5% 麦芽末培地, 30℃ の条件で行った. また, 生菌数の測定はコロニーカウント法によって行い,細胞膜障害作用の指標として細胞内 $K^+$ の細胞外への漏出を測定した. ROS の測定ならびに液胞膜の観察は蛍光試薬で処理した細胞を用いて行った.

【結果】polygodial は濃度依存的に *S. cerevisiae* の生菌数を減少させ, ROS を産生しない条件においても液胞膜の破壊を促進した. 一方, drimendiol は殺菌作用を示さず, 同誘導体からは細胞膜障害作用と液胞膜破壊作用の両者が失われていた. この結果は, polygodial の殺真菌作用にアルデヒド基が深く関わっていることを示している. また, アルデヒド基の存在は, polygodial が液胞膜に作用するために必須であるとみなされた. dicarboxyl derivative の活性については現在検討中である.

1) Kondo, T. *et al*., (2016). Vacuole disruption as the primary fungicidal mechanism of action of polygodial, a sesquiterpene dialdehyde. *Planta Medica, in press.*

polygodial, fungicidal activity, vacuole

発表責任者：田中　俊雄（tanakato@sci.osaka-cu.ac.jp）

講演番号：3C14p08
講演日時：3 月 19 日 15:55～ C 校舎 14 会場

# ナギ科植物由来成分ナギラクトン E の抗真菌作用

# The antifungal action of nagilactone E, derived from Pocarpaceae

○林 謙吾[1]、山口 良弘[1,2]、荻田 亮[1,3]、田中 俊雄[1]、藤田 憲一[1] ([1]阪市大院・理、[2]阪市大・複合先端、[3]阪市大・健康・研セ)
○Kengo HAYASHI[1], Yoshihiro YAMAGUCHI[1,2], Akira OGITA[1,3], Toshio TANAKA[1], Ken-ichi FUJITA[1] ([1]Grad. Sch. Sci., Osaka City Univ., [2]OCARINA, Osaka City Univ., [3]Res. Center Urban Health & Sports, Osaka City Univ.)

ナギラクトン類は、マキ科マキ属植物のナギ（*Podocarpus nagi*）の根皮から得られるノルジテルペン類の一種であり、植物に対する生育阻害作用を示し、シカなどの草食哺乳動物に対する摂食忌避作用も示すことが報告されている。ナギラクトン類の中でも、ナギラクトン E は、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* や病原性真菌の一つである *Candida albicans* に対して抗真菌作用を示し、フェニルプロパノイドの一種であるアネトールやイソサフロールと併用した場合、その作用が増幅されることが先行研究により明らかにされている。しかし、ナギラクトン E 自身の抗真菌作用や相乗効果が起こるメカニズムは不明である。

本研究では *S. cerevisiae* BY4741 株を用いてナギラクトン E の作用メカニズムを解明しようとした。まず、ナギラクトン E で酵母を処理した後、生菌数の変化をコロニーカウント法により測定したところ、生菌数の減少は確認されなかったが、生菌数の増加を抑制していることが確認された。ナギラクトン E の最小生育阻害濃度は 25 μg/ml となった。次いで、本物質が細胞膜障害を引き起こすのかを検討した。テトラフェニルホウ酸法により酵母細胞からの $K^+$の漏出を定量したところ、薬剤処理 4 時間後に濃度依存的に $K^+$の漏出を確認することができた。以上の結果より、ナギラクトン E は出芽酵母に対して静菌的な抗真菌作用を示し、その作用機序として、$K^+$の漏出を伴う細胞膜障害が関与している可能性が示唆された。

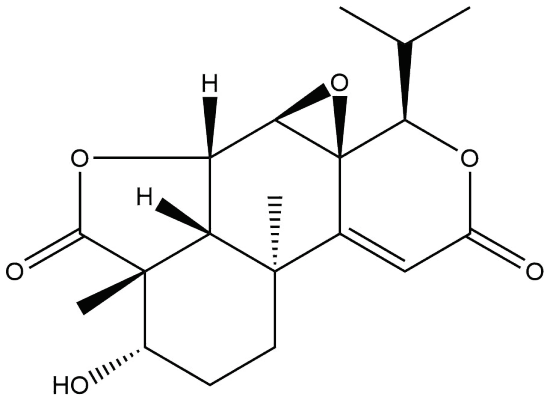



図　ナギラクトン E の構造

nagilactone E, antifungal, membrane injury

講演番号：3C14p09
講演日時：3 月 19 日 16:10～ C 校舎 14 会場

出芽酵母のイソアミルアルコール誘導偽菌糸の微小管伸長不全における Kar9 の関与
Involvement of Kar9 in elongation deficiency of cytoplasmic microtubule during isoamyl alcohol-induced pseudohyphal formation of budding yeast.
○村田 和加惠[1]、山口 良弘[2,3]、荻田 亮[2,4]、藤田 憲一[2]、田中 俊雄[2] ([1]米子高専物質、[2]阪市大院理、[3]阪市大複合先端、[4]阪市大健康研セ)
○Wakae MURATA[1], Yoshihiro YAMAGUCHI[2,3], Akira OGITA[2,4], Ken-ichi FUJITA[2], Toshio TANAKA[2] ([1]Yonago Natl. Coll. Technol., [2]Grad. Sch. Sci., Osaka City Univ., [3]OCARINA, [4]Res. Center. Urban Health Sports, Osaka City Univ.,)

出芽酵母はイソアミルアルコール(IAA)の存在下で偽菌糸を形成することが知られている。偽菌糸形成に際して細胞骨格にダイナミックな変動が起こっていると想定される。本研究では、細胞骨格分子の動態に着目して、IAA 誘導偽菌糸の形態形成メカニズムの一端を解明することを目的とした。

蛍光顕微鏡を用いて、F-アクチンおよび微小管の局在を観察した結果、IAA 誘導偽菌糸において、F-アクチンは出芽の先端に凝集し続けた。一方、紡錘体微小管の配向異常を示す細胞が観察され、さらに、紡錘体微小管の配向が正常であっても細胞質微小管が出芽の先端まで伸長していない細胞が数多く出現することが明らかとなった。

上記の結果より、微小管の配向や伸長に関わる微小管結合タンパク質と、それらと相互作用するアクチン結合タンパク質との相互作用に何らかの異常があると想定し、微小管と F-アクチンをリンクする微小管結合タンパク質 Bim1、アクチン結合タンパク質である Myo2、さらに Bim1 と Myo2 に結合するタンパク質である Kar9 に着目した。Bim1、Kar9 および Myo2 の局在を調べたところ、IAA 誘導偽菌糸における Bim1 の配向異常が観察され、微小管の挙動と類似性が観察された。Kar9 においては細胞の内部への局在が多数観察された。一方で、Myo2 は F-アクチンと同じように、出芽の先端に局在し続けた。以上の結果に基づいて、*BIM1* および *KAR9* 過剰発現株を作成し、その細胞形態を観察した。その結果、*KAR9* 過剰発現株で、IAA 非存在下においても親株よりも細胞が伸長しているということが明らかになった。従って、細胞質微小管の伸長不全には Kar9 と Myo2 の結合異常が関与している可能性が高いことがわかった。

以上より、細胞質微小管が出芽の先端まで伸張しないことがシグナルとなり、細胞質分裂が遅延するとともに、出芽の先端に F-アクチンが凝集し続け、先端成長し続けることによって、出芽が伸長し、偽菌糸が形成されるのではないかと結論した。

*Saccharomyces cerevisiae*, microtubule, Kar9

講演番号：3C14p10
講演日時：3 月 19 日 16:25～ C 校舎 14 会場

# 低酸素誘導因子の分子間相互作用や転写活性に対する 4-O-メチルアスコクロリンの作用機序の解析
# Mechanism of action of 4-O-methylascochlorin on molecular interaction and transcriptional activation of hypoxia-inducible factor

○近藤 哲也[1]、武田 賢治[1]、馬替 純二[2]、片岡 孝夫[1]（[1]京都工芸繊維大学応用生物、[2]馬替生科研）
○Tetsuya KONDO[1], Kenji TAKEDA[1], Junji MAGAE[2], Takao KATAOKA[1]（[1]Dept. Appl. Biol., Kyoto Inst. Tech., [2]Magae Biosci. Inst.）

【目的】低酸素誘導因子 HIF (hypoxia-inducible factor)の一つである HIF-1α は、通常酸素圧ではプロリルヒドロキシラーゼ PHDs（prolyl hydroxylases）によって水酸化を受ける。この水酸化されたプロリン残基が pVHL（von-Hippel-Lindau）を含む E3 ユビキチンリガーゼ複合体によって認識されると、HIF-1α はユビキチン化され、26S プロテアソーム依存的に分解される。一方、低酸素状態では、PHDs が不活性化されるため、HIF-1α は分解されず安定化する。HIF-1α は、恒常的に発現している HIF-1β とヘテロ二量体を形成し、低酸素応答配列 HRE（hypoxia response element）に結合することによって、アポトーシス、血管新生、細胞増殖等に関係する遺伝子の発現を誘導する。4-*O*-メチルアスコクロリン MAC（4-*O*-methylascochlorin）は、植物病原菌 *Aschochyta viciae* から単離されたアスコクロリン誘導体である。昨年度の本学会において、MAC が HIF-1α タンパク質のプロリン水酸化を阻害していることを報告した。本研究では、HIF-1α の転写活性や分子間相互作用に対する MAC の作用機序を解析した。
【方法】エノラーゼ遺伝子は低酸素応答遺伝子の一つである。HRE を含むヒト ENO1 遺伝子プロモーター領域（-416～-349）を組み込んだルシフェラーゼレポータープラスミドを構築した。レポータープラスミドをヒト繊維肉腫 HT-1080 細胞にトランスフェクションした後、ルシフェラーゼ活性を測定した。ヒト PHD2、もしくは pVHL をリポフェクション法によって HT-1080 細胞に一過的に過剰発現させ、PHD2 もしくは pVHL と内在性 HIF-1α の分子間相互作用を免疫沈降法とウェスタンブロッティングによって調べた。
【結果と考察】HRE 応答性のルシフェラーゼレポーターを HT-1080 細胞に導入し、MAC (10 μM)で 4 時間もしくは 16 時間処理すると、ルシフェラーゼレポーター活性が顕著に亢進した。したがって、MAC は低酸素応答遺伝子の発現を誘導することが明らかになった。PHD2 を一過的に発現させた HT-1080 細胞を MAC の存在下もしくは非存在下で 4 時間処理したところ、MAC 存在下で PHD2 と HIF-1α の分子間相互作用が観察された。一方、pVHL を一過的に発現させた HT-1080 細胞を MG-132 の存在下で 6 時間処理したところ、pVHL と HIF-1α の分子間相互作用が認められたが、その相互作用は MAC によって顕著に阻害された。これらの結果から、MAC が PHD2 による HIF-1α のプロリン水酸化を阻害することによって、PHD2 と HIF-1α の分子間相互作用を安定化するが、プロリン水酸化によって起こる HIF-1α と pVHL の結合を阻害していることが示唆された。

hypoxia-inducible factor, 4-O-methylascochlorin, prolyl hydroxylase

講演番号：3C14p11
講演日時：3 月 19 日 16:50～ C 校舎 14 会場

# 細胞接着因子の発現誘導と糖鎖修飾に対する五環性トリテルペノイドの作用機序の解析

# Molecular mechanism of pentacylic triterpenoids on induced expression and glycan modification of cell adhesion molecules

○平松 令子、馬場 康輔、片岡 孝夫（京都工繊大院・応生）
○Reiko HIRAMATSU, Kousuke BABA, Takao KATAOKA (Dept. Appl. Biol., Kyoto Inst. Tech.)

【目的】五環性トリテルペノイドは、植物等に多く含まれる毒性の少ない天然化合物であり、近年、抗がん作用などの様々な生物活性を持つことが報告されている。我々は、五環性トリテルペノイドであるウルソール酸 (ursolic acid)が、細胞接着因子intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)の細胞内輸送を阻害することにより、細胞表面の発現を抑制することを明らかにした[1,2]。さらに、ウルソール酸の構造異性体であるベツリン酸 (betulinic acid)とオレアノール酸 (oleanolic acid)がα-グルコシダーゼ活性を阻害することにより、細胞レベルでのICAM-1のN結合型糖鎖修飾に作用するが、細胞表面へのICAM-1の輸送を阻害しないことを報告した[3,4]。本研究では、ウルソール酸の類縁体であるコロソール酸(corosolic acid)、アシアチン酸 (asiatic acid)、マスリン酸 (maslinic acid)の糖タンパク質の糖鎖修飾に対する作用機序を明らかにすることを目的とした。
【方法】ヒト肺がん腫A549細胞を五環性トリテルペノイドで1時間処理した後、炎症性サイトカインであるinterleukin-1α (IL-1α) で刺激しICAM-1の発現を誘導した。細胞生存率に対する影響をクリスタルバイオレット法、細胞表面のICAM-1発現をCell ELISA法、並びに細胞内のICAM-1の発現量や分子量の変化をウェスタンブロッティングで調べた。
【結果】Cell-ELISA 法とクリスタルバイオレット法により、細胞生存率をほとんど阻害しない濃度において、コロソール酸とマスリン酸が細胞表面の ICAM-1 発現を阻害したが、アシアチン酸は細胞表面の ICAM-1 の発現をほとんど阻害しないことを見出した。一方、これら 3 種類の五環性トリテルペノイドは、ICAM-1 の低分子量化を誘導し、その大きさはベツリン酸やオレアノール酸処理のものと異なり、ウルソール酸処理のものと類似していた。ウルソール酸は、小胞体からゴルジ体への細胞内輸送を阻害し、高マンノース型糖鎖をもった ICAM-1 を小胞体に蓄積させる。以上の結果から、コロソール酸とマスリン酸はウルソール酸と同様に糖タンパク質の細胞内輸送の阻害活性をもっているが、アシアチン酸は N 結合型糖鎖修飾のみに作用していることが示唆された。
【参考文献】
1. Mitsuda, S. *et al.*, FEBS Open Bio, 4, 229–239 (2014)
2. 三津田智嗣ら、日本農芸化学会 2014 年度大会、2A05p14 (2014)
3. Hiramatsu, R. *et al.*, Eur. J. Pharmacol., 767, 126–134 (2015)
4. 平松令子ら、日本農芸化学会 2016 年度大会、4B050 (2016)

asiatic acid, corosolic acid, maslinic acid

講演番号：3C14p12
講演日時：3 月 19 日 17:05～ C 校舎 14 会場

# Allantopyrone A binds or crosslinks TNF receptor 1 and inhibits TNF-α-induced signaling pathway

○Hue Tu QUACH[1], Junpei YOKOIGAWA[1], Yoshihito SHIONO[2], Ken-ichi KIMURA[3], Takao KATAOKA[1] ([1]Kyoto Institute of Technology, [2]Yamagata Univ., [3]Iwate Univ.)

**Purpose**

The pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor (TNF) α induces the activation of the transcription factor nuclear factor κB (NF-κB) signaling pathway. Allantopyrone A was initially isolated from an endophytic fungus *Allantophomopsis lycopodina* KS-97.[1] We previously showed that allantopyrone A inhibited the TNF-α-dependent NF-κB signaling pathway upstream of the activation of IκB kinase.[2] In this study, the molecular mechanism by which allantopyrone A inhibits the NF-κB signaling pathway was further investigated.

**Methods**

Human lung carcinoma A549 cells were preincubated with allantopyrone A and incubated with glutathione S-transferase (GST)-tagged TNF-α. Cell lysates were prepared and then pulled down with glutathione sepharose 4B. Human embryonic kidney (HEK) 293T cells were transfected with human FLAG-tagged TNF receptor 1 (TNF-R1) and their mutants, and then incubated with allantopyrone A. Cell lysates were analyzed by Western blotting.

**Results and Discussion**

GST-tagged TNF-α induced the recruitment of TRADD, RIP1, and TRAF2 to TNF-R1 in A549 cells. Allantopyrone A inhibited the recruitment of TRADD, RIP1, and TRAF2 to TNF-R1 at concentrations that did not affect their expression levels. We found that allantopyrone A increased the amount of TNF-R1 bands migrating at slightly over 100 kDa, which might correspond to their dimeric forms of monomeric TNF-R1 migrating at 59 kDa. In HEK293T cells transfected with FLAG-tagged full-length TNF-R1, allantopyrone A also increased the amount of TNF-R1 bands around 100 kDa. Moreover, allantopyrone A induced the crosslinked bands of extracellular part of TNF-R1 in HEK293T cells. Allantopyrone A possesses two α,β-unsaturated carbonyl moieties highly reactive to cysteine thiol groups. These results suggest that allantopyrone A directly binds or crosslinks cysteine-rich domains of TNF-R1 and inhibits the NF-κB signaling pathway induced by TNF-α.

**References**

1. Shiono, Y. *et al.* J. Antibiot., 63, 251-253 (2010)
2. Yokoigawa, J. *et al.* J. Antibiot., 68, 71-75 (2015)

Allantopyrone A, TNF receptor 1, NF-κB signaling pathway

講演番号：3C14p13
講演日時：3 月 19 日 17:20～ C 校舎 14 会場

# 炎症性サイトカインによって誘導される細胞接着因子に対する kujigamberol の作用機序の解明
# Mechanism of kujigamberol on cell adhesion molecules induced by proinflammatory cytokines

○福原 早友里[1]、木村 賢一[2]、片岡 孝夫[1] ([1]京都工芸繊維大学・応生、[2]岩手大学・農)
○Sayuri FUKUHARA[1], Ken-ichi KIMURA[2], Takao KATAOKA[1] ([1]Dept. Appl. Biol., Kyoto Inst. Tech, [2]Fac. of Agri., Iwate Univ.)

【目的】Kujigamberol は、岩手県久慈産琥珀から、遺伝子変異酵母を用いたスクリーニングによって見出された化合物である [1]。我々は、ヒト臍帯静脈内皮細胞 human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)において、kujigamberol が炎症性サイトカイン interleukin-1α (IL-1α)によって誘導される細胞接着因子 intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)の糖鎖修飾に作用することを見出した。本研究では、ICAM-1 を含む細胞接着因子に対する kujigamberol の作用機序の解明を目的とした。
【方法】HUVEC を kujigamberol で 1 時間培養した後、IL-1α の存在下で 6 時間培養した。Cell ELISA 法により細胞表面の ICAM-1 の発現量を測定し、MTT 法により細胞生存率を調べた。細胞接着因子の発現量及び分子量をウェスタンブロッティングによって解析した。さらに Endo H 及び PNGaseF で糖タンパク質を切断し、糖鎖修飾に対する影響を検討した。
【結果と考察】Cell ELISA 法と MTT 法により、HUVEC を kujigamberol で処理すると、50 μM の濃度で HUVEC の細胞生存率が低下したが、細胞生存率が低下しない濃度で、kujigamberol は細胞表面の ICAM-1 の発現を阻害しなかった。一方、ウェスタンブロッティングの結果から、kujigamberol が細胞生存率を低下させない濃度から、ICAM-1 の低分子量化を誘導することを見出した。カスパーゼ阻害剤 z-VAD-fmk によってカスパーゼを阻害した条件下においても、kujigamberol によって ICAM-1 の低分子量化が観察された。他の細胞接着因子である vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)や E-selectin に対する kujigamberol の影響を検討したところ、kujigamberol は VCAM-1 及び E-selectin に対して低分子量化ではなく、むしろ発現量を顕著に低下させることが明らかになった。Kujigamberol によって低分子量化が誘導された ICAM-1 は Endo H 耐性であった。さらに、細胞内輸送や糖鎖修飾に作用する阻害剤と比較したところ、kujigamberol による ICAM-1 の低分子量化は castanospermine や 1-deoxymannojirimycin と類似した作用を示した。そこで、α-グルコシダーゼ及び α-マンノシダーゼに対する kujigamberol の直接的な影響を検討したところ、α-グルコシダーゼに対してのみ部分的な阻害を示した。以上の結果より、kujigamberol は HUVEC において糖タンパク質のプロセシングに作用するが、その作用が細胞接着因子の種類によって異なることが示唆された。
【参考文献】
1. Kimura, K. *et al.* Fitoterapia 83, 907-912 (2012)

kujigamberol, cell adhesion molecules, intercellular adhesion molecule-1

講演番号：3C14p14
講演日時：3 月 19 日 17:35～ C 校舎 14 会場

味噌特有のヒストン修飾制御活性成分の研究
Food ingredients from "Miso" that affect histone modification
○中村 文彬、川村 緑、新井 大祐、塩田 邦夫郎、中尾 洋一（早大理工）
○Fumiaki NAKAMURA, Midori KAWAMURA, Daisuke ARAI, Kunio SHIOTA, Yoichi NAKAO (Waseda Univ.)

日本食の特徴的な食材である味噌には、発酵によって原材料中の成分から生じる多くの二次代謝産物が含まれている。これら多様な二次代謝産物は様々な生理作用を有すると考えられるため、味噌は天然物化学の視点から見て非常に興味深い研究対象である。

ところで、エピジェネティックな遺伝子発現制御機構のひとつであるヒストン分子 *N*末端部位の化学修飾は、細胞の機能や恒常性の長期保証に関与することが知られる。ヒストン修飾をコントロールできる成分を味噌中に見出すことができれば、味噌の効用について新たな科学的根拠を示せるのではないかと考えて、活性成分の探索研究を行った。

産地や原料が異なる市販の味噌 117 種をそれぞれアルコール抽出および ODS flash カラムクロマトグラフィーにより 6 つに分画し、スクリーニングサンプルとした。これを HeLa 細胞に添加し、20 時間培養の後、ヒストン修飾特異的モノクローナル抗体を用いた免疫染色による活性試験を行った。この結果、ひとつの味噌サンプルから調製した 70% MeOH 溶出画分に、ヒストン H4 の 5 番目のリシン残基側鎖のアセチル化（H4K5ac）レベルを抑制する活性を見出した。

そこで、本味噌サンプル（1 kg）を抽出して活性本体の精製を行ったところ、活性化合物 2.3 mg を単離することができた。得られた活性化合物の MS および NMR スペクトルを解析した結果、活性化合物をフェルラ酸エチルエステル（FAEE）であると同定できた。

FAEE は、味噌の発酵過程において、麹菌由来のエステラーゼによって植物の細胞壁から遊離したフェルラ酸（FA）にアルコールが付加することで産生されたと考えられた。これまでに FAEE が味噌に含まれるという報告はばされていないが、以上のことから FAEE は味噌に特徴的な成分であると考えられる。FAEE は濃度依存的に H4K5ac レベルを抑制し、有効濃度は 25 μM であった。また、FAEE は前駆体である FA よりも強い活性を示した。そこで FAEE の類縁体（計 19 種類）について構造－活性相関を調べた結果、置換基や側鎖を変化させた各種構造類縁体の中で FAEE が最も強い H4K5ac 抑制活性を示すことがわかった。

epigenetics, miso, ferulic acid ethyl ester

講演番号：3C14p15
講演日時：3 月 19 日 17:50～ C 校舎 14 会場

セリ科植物由来 GSK-3β阻害物質 falcarindiol の肝がん由来細胞における作用特性の解析
Effects of GSK-3β inhibitor falcarindiol isolated from Apiaceae on hepatoma.
○吉田 潤[1]、木村 賢一[2] ([1]岩手医大・教養教育セ・化学、[2]岩手大・農)
○Jun Yoshida[1], Ken-ichi Kimura[2] ([1]Center Lib. Arts & Sci., Iwate Med. Univ., [2]Fac. of Agri., Iwate Univ.)

【目的】近年、新たな作用機序に基づく 2 型糖尿病予防・治療剤の有効成分として、グリコーゲンシンターゼキナーゼ-3β(GSK-3β)を阻害する物質が注目されている。我々はこれまでに、$Ca^{2+}$超感受性の遺伝子変異酵母 YNS17 株(*zds1*Δ *erg3*Δ *pdr1/3*Δ)を用いた薬剤スクリーニング系により天然資源から GSK-3β阻害物質を探索し、セリ科植物に主に含まれるポリアセチレン化合物の falcarindiol を活性物質として同定した[1)]。Falcarindiol は、ラット肝がん由来細胞株 H4IIE におけるグルコース産生を抑制し、その作用は Akt 非依存的な GSK-3β不活性化によることが示唆されている。これまでの結果を基に本研究では、falcarindiol と既存の GSK-3β阻害剤または AMPK 活性化剤の作用とを比較して falcarindiol の作用特性を明らかにすることを目的とした。
【方法】H4IIE 細胞を $2\times10^5$ cells/well で 12-well プレートに播き、2 日間培養後に無血清培地に交換して一晩培養した。その後、様々な濃度の falcarindiol、各種 GSK-3β阻害剤、または AMPK 活性化剤を添加して 0.5～3 時間培養した。サンプル処理後の H4IIE 細胞における GSK-3β、Akt、AMPK、または p70S6K のタンパク質リン酸化レベルの変化を、ウエスタンブロット法で調べた。ポジティブコントロールとして、インスリン(ウシ)を用いた。
【結果】20 μM falcarindiol 処理群では、0.5 時間～3 時間で GSK-3β不活性化(Ser9 リン酸化)、0.5～1 時間で AMPKα活性化(Thr172 リン酸化)、及び 1 時間で p70S6K 活性化(Thr389 リン酸化)がみられた。同条件下で、GSK-3β阻害剤の LiCl、TDZD-8、及び BIO の作用を調べたところ、40 mM LiCl 処理群と 15 μM TDZD-8 処理群では 0.5～3 時間で GSK-3β リン酸化(Ser9)が増加し、15 μM BIO 処理群では 0.5～1 時間で GSK-3β リン酸化(Ser9)が減少した。また、TDZD-8 処理群と BIO 処理群では、それぞれ 0.5～1 時間と 0.5～3 時間で p70S6K リン酸化(Thr389)が増加し、LiCl 処理群は 0.5～3 時間で変化がみられなかった。AMPK 活性化剤の AICAR の作用を調べたところ、0.5 mM AICAR 処理群では、0.5～3 時間で AMPKα リン酸化(Thr172)が増加し、Akt リン酸化(Ser473)と p70S6K リン酸化(Thr389)に変化がみられなかった。10 nM インスリン処理群では、1 時間で Akt リン酸化(Ser473)、GSK-3β リン酸化(Ser9)、p70S6K リン酸化(Thr389)が顕著に増加した。以上より、H4IIE 細胞における falcarindiol の糖新生抑制活性は、GSK-3β不活性化、AMPKα活性化、p70S6K 活性化が関連し、その作用機序がインスリンとは異なり ATP 非拮抗型 GSK-3β阻害剤の TDZD-8 に類似することが示唆された。
1) Yoshida J., *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 61(31), 7515-7521 (2013)

falcarindiol, GSK-3β, gluconeogenesis

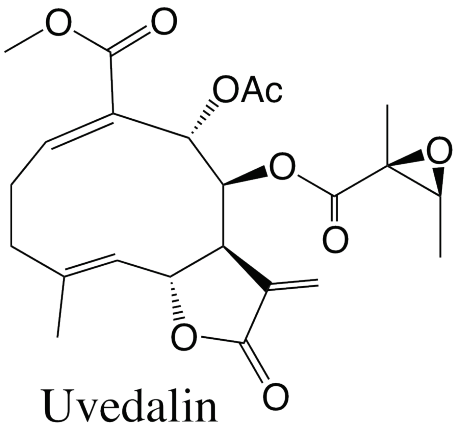
発表責任者：吉田 潤（jyoshida@iwate-med.ac.jp）

講演番号：3C14p16
講演日時：3 月 19 日 18:05～ C 校舎 14 会場

# キク科植物ヤーコン葉部の繊毛で生合成されるセスキテルペンラクトン類の昆虫摂食阻害活性
# Insect antifeedant sesquiterpene lactones produced in the trichomes on yacon leaves

○森本 正則、松田 一彦（近畿大農）
○Masanori MORIMOTO, Kazuhiko MATSUDA (Kindai Univ.)

【目的】ヤーコン(*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Rob)は、アンデス原産のキク科多年生草本で肥大した根を食用とする。本種は、病害虫抵抗性が高いことから栽培が容易である。本種の葉部裏面には、直径約 0.4 mm の正円状の多くの腺毛があり、これが本種の高い病害虫抵抗性に関与している可能性があると考えられた。そこで本研究では、本種の腺毛に含まれる成分と植食性昆虫に対する摂食阻害活性を評価することで、腺毛の持つ化学防御的意義を明らかにすることを目的とした。
【方法と結果】ヤーコンは、奈良県生駒市高山地区で栽培したものを 11 月中旬に採取した。採取した葉部を塩化メチレン(DCM)で数秒洗浄した後、減圧濃縮して淡黄色油状物として葉部滲出物を回収した(収率: 約 1%)。DCM 洗浄処理後の葉部は、さらに DCM で数日間抽出後、植物体を濾別、減圧濃縮して DCM 抽出物を調製した。本種の葉部裏面の低真空 SEM 観察では、多くの腺毛が観察され、葉部滲出物回収時と同様の DCM 洗浄処理でそれらが消失したことを確認した。昆虫食害抵抗性試験には、チョウ目害虫であるハスモンヨトウ(*Spodoptera litura* F.)3 齢幼虫を用いた選択的リーフディスク試験を採用した。この生物検定において、ヤーコン葉部滲出物は 151 μg/cm$^2$ の処理量で完全に供試昆虫の摂食行動を阻害したのに対して、DCM 抽出物は滲出物よりも低い昆虫摂食阻害活性を示した。そこでヤーコン葉部滲出物をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーで分画し、Melampolide として知られるセスキテルペンラクトン化合物 Uvedalin (5-Acetoxy-4-epoxyangeloyloxy-6-methylcarboxygermacrenolide)を単離・同定した。Uvedalin は、38 μg (84 nmol)/cm$^2$ の処理量でハスモンヨトウ幼虫に対して顕著な摂食阻害活性を示した。本化合物は、植物体にはほとんど含まれず、その大半が滲出物に含まれていることから腺毛の主成分であり、植食性昆虫抵抗性に寄与していることが示唆された。また本化合物は高度に酸化されていることから、これにより生じる置換基パターンの多様性が摂食阻害活性に関与している可能性があると推察された。現在、ヤーコン葉部滲出物から Uvedalin 関連化合物の単離を進めるとともに、それらの構造改変による活性発現への影響について検討中である。



Uvedalin

Yacon, Insect antifeedant, Sesquiterpene lactone

発表責任者：森本正則（masanori@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：3C15a01
講演日時：3 月 19 日 09:20～ C 校舎 15 会場

# 海藻多糖によるアミロイド線維形成阻害

# The effects of seaweed polysaccharides on inhibition of amyloid fibrillation

○八木 寿梓[1]、木下 竣貴[2]、柏原 直樹[3]、川本 仁志[4]、三木 康成[4]、鈴木 宏和[2]、大城 隆[2]([1]鳥大・工・GSC、[2]鳥大院・工、[3]鳥大・工、[4]海産物のきむらや)
○Hisashi YAGI[1], Toshiki KINOSHITA[2], Naoki KASHIHARA[3], Hitoshi KAWAMOTO[4], Yasunari MIKI[4], Hirokazu SUZUKI[2], Takashi OHSHIRO[2] ([1]GSC, Tottori Univ., [2]Grad. School of Eng., Tottori Univ., [3]Fac. Eng., Tottori Univ., [4]Marine Products Kimuraya Co., Ltd.)

【目的】タンパク質の異常凝集体の一つであるアミロイド線維は、アルツハイマー病、II 型糖尿病、角膜変性症など多くの疾患の原因産物として知られている。アミロイド線維が原因である疾患を総称してアミロイドーシスと呼び、高齢に伴い発症する疾患に多く見られ、その疾患数は年々増加傾向にある。このアミロイドーシスに対する根治的な治療方法は開発されておらず、対処療法が行われている。従って、このような疾患に対しては予防方法を開発することが課題となっている。我々は、アミロイドーシスの共通機構であるアミロイド線維形成に着目し、線維形成を阻害することで発症が予防できると考え、その阻害物質として海藻多糖を選択し効果を調べた。
【実験】海藻多糖は、ラミナラン（褐藻）、κ-カラギーナン（紅藻）、λ-カラギーナン（紅藻）、各種フコイダン（褐藻：モズク、ガゴメコンブ、アカモク）を選択し、これらの比較としてデンプンを用いた。標的タンパク質としてインスリノーマ原因タンパク質であるインシュリンを用い、インシュリンのアミロイド線維形成に対する各種多糖の効果を調べた。線維形成の有無に関しては、アミロイド特異的蛍光色素であるチオフラビン T を用いた蛍光経時変化測定で調べた。また、多糖がインシュリンの二次構造に及ぼす影響は円二色性分光法 (CD)、反応後の形態は透過型電子顕微鏡(TEM)で調べた。
【結果と考察】はじめにインシュリンのアミロイド線維形成に対するデンプンの効果について調べた結果、蛍光経時変化測定において多糖未添加のインシュリンと比較して変化がなく阻害効果は見られなかった。次に、ラミナラン、κ-カラギーナン、λ-カラギーナンの効果を調べた結果、それぞれにおいて数時間程度の線維形成時間の遅延が見られた。しかしながら、反応後の蛍光強度の値が多糖未添加のインシュリンと同程度であったため、最終的にアミロイド線維を形成したと考えられた。他方、フコイダンにおいては他の多糖と異なり、大幅に線維形成の阻害効果が見られた。その阻害効果はアカモク、ガゴメコンブ、モズクの順に強い効果が得られた。特に、アカモクフコイダンは加水分解処理で低分子化してもその阻害効果は変わらなかった。アカモクフコイダンがインシュリンの二次構造に及ぼす影響について CD で調べた結果、反応開始後と終了後にスペクトルの変化は見られず、アミロイド線維形成過程に生じる構造変化を抑制していることがわかった。反応後の形態を TEM で観察した結果、不定形の凝集が観察され、線維形成を阻害していることを視覚的にも示された。多くの生理活性が報告されているフコイダンが、アミロイドーシスの原因であるアミロイド線維においても有用であることが示唆され、新たな付加価値を見出した。

fucoidan, amyloid fibril, inhibition

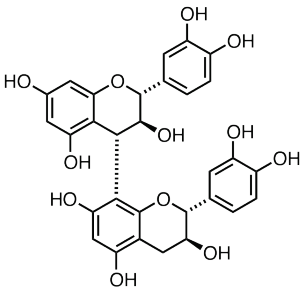
発表責任者：八木　寿梓（yagi@bio.tottori-u.ac.jp）

講演番号：3C15a02
講演日時：3 月 19 日 09:35～ C 校舎 15 会場

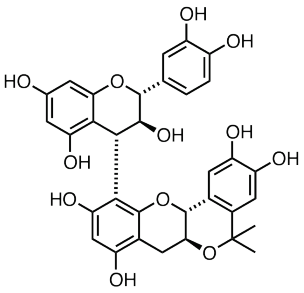
アミロイドβによる神経細胞毒性を抑制するプロアントシアニジン誘導体の開発
Synthesis of proanthocyanidin analogue for the treatment of Alzheimer's disease
○水野 美麗[1]、森 一憲[1]、中西 郁夫[2]、松本 謙一郎[2]、柴沼 質子[1]、福原 潔[1] ([1]昭和大、[2]放医研)
○Mirei MIZUNO[1], Kazunori MORI[1], Ikuo NAKANISHI[2], Ken-ichiro MATSUMOTO[2], Motoko SHIBANUMA[1], Kiyoshi FUKUHARA[1] ([1]Showa Univ., [2]NIRS)

臨床で使用されているアルツハイマー病治療薬は、進行を遅らせるに留まり、根本的治療が期待できる薬は未だ開発されていない。病理学的特徴の１つにアミロイドβ(Aβ)凝集による老人斑の形成があげられ、この過程で活性酸素を発生し、神経細胞を傷害することが知られている。ポリフェノールはAβ凝集阻害作用を持つことが知られているが、その作用は決して強力ではない。

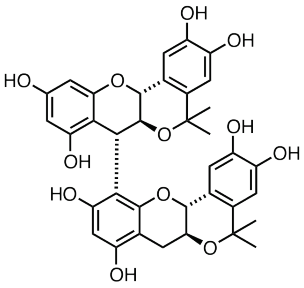
当研究室ではカテキンの立体構造を平面に固定化した平面型カテキンを開発した。カテキンに比べてラジカル消去反応速度が約 5 倍増加し、α-グルコシダーゼ阻害作用やAβ凝集阻害作用など新規生理活性を有することも報告した。我々は、カテキンの重合体であるプロアントシアニジンに注目した。これはカテキン単量体と比べて高い抗酸化作用を有し、動脈硬化の進展に関与する LOX-1 を阻害する作用が報告されている。LOX-1 は血中の酸化 LDL と結合することにより、血管内皮細胞の機能的変化を起こす。この過程で、活性酸素が産生されることが知られている。酸化 LDL は LOX-1 のレクチン様ドメインで認識される。これより糖と類似した構造を持つ平面型カテキンは、LOX-1 のレクチン様ドメインに対する強い結合親和性が期待される。そこで LOX-1 への親和性向上及び抗酸化活性の増強を期待し、カテキンの二量体であるプロシアニジン B 3 (Cat-Cat)の一方及び両方の立体構造を平面に固定化した新規誘導体 **1** (Cat-PCat)と **2** (PCat-PCat)を合成した。これらの抗酸化活性を評価したところ、PCat-PCat(**2**)＞Cat-PCat(**1**)＞Cat-Cat であった。



procyanidin B3 (Cat-Cat)



Cat-PCat (**1**)



PCat-PCat (**2**)

本研究では、新規誘導体(**1**)(**2**)における立体構造の固定化が、LOX-1 阻害作用のみならず、Aβ凝集阻害及び凝集過程で発生する活性酸素の消去においても有用であることを期待し、SH-SY5Y 細胞を用いたAβによる細胞死の抑制作用について検討した。その結果、両方の立体構造を平面に固定化した PCat-PCat(**2**)は、Aβによる神経毒性を強力に抑制することがわかった。

Alzheimer's disease, proanthocyanidin, amyloid ß

発表責任者：水野　美麗（mizuno@pharm.showa-u.ac.jp）

講演番号：3C15a03
講演日時：3 月 19 日 09:50～ C 校舎 15 会場

# アルツハイマー病治療薬を目指したアミロイドβの C 末端ペプチドモチーフを有するフェノール性抗酸化剤の開発

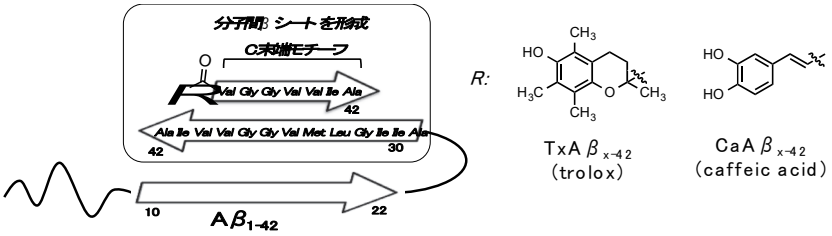
# Inhibition of Aß42-induced neurotoxicity by C-terminal peptide analogues of ß-Amyloid

○福原 潔[1]、荒井 卓也[1,2]、大野 彰子[3]、森 一憲[1]、柴沼 質子[1]、宮田 直樹[2]、中川 秀彦[2] ([1]昭和大、[2]名市大、[3]国衛研)

○ KIyoshi FUKUHARA[1], Takuya ARAI[1,2], Akiko OHNO[3], Kazunori MORI[1], Motoko SHIBANUMA[1], Naoki MIYATA[2], Hidehiko NAKAGAWA[2] ([1]Showa Univ., [2]Nagoya City Univ., [3]NIHS)

アルツハイマー病(AD)患者の脳内に高発現しているアミロイドβタンパク質(Aβ)は，高い凝集能を示しアミロイド繊維からなる老人斑を形成して大脳皮質に沈着する．この凝集過程で発生する活性酸素が神経細胞毒性や血管障害の原因になると考えられている．Aβには，40 のアミノ酸からなるペプチド($A\beta_{1-40}$)および C 末端にさらに二つのアミノ酸(Ileu-Ala)が増えたペプチド($A\beta_{1-42}$)がある．$A\beta_{1-42}$の方が凝集し易く，神経細胞毒性も高い．$A\beta_{1-42}$は疎水性アミノ酸で構成されている C-末端部分が分子間でβシート構造を形成し，それが核となって凝集反応が進行する．我々は$A\beta_{1-42}$の C 末端ペプチドモチーフ($A\beta_{n-42}$)が Aβに対する認識ペプチドとして作用すると考え、$A\beta_{n-42}$にフェノール性抗酸化物質(Trolox:Tx, Caffeic acid:Ca)を結合させた AD 治療薬($TxA\beta_{n-42}$, $CaA\beta_{n-42}$)を設計・合成した． $TxA\beta_{n-42}$, $CaA\beta_{n-42}$が$A\beta_{1-42}$の C 末端部分とβシート構造を形成すると，$A\beta_{1-42}$の分子間でのβシート形成が阻害されて線維形成が抑制される．さらに，Tx，Ca によるラジカル消去活性によって，$A\beta_{1-42}$に由来する酸化ストレスが抑制される．

Fmoc 法によって$A\beta_{1-42}$の C 末端の Ala から n 番目のアミノ酸まで配列を伸張させた後，Tx または Ca を縮合させて，C 末端部分から n 番目までのペプチドモチーフを有する$TxA\beta_{n-42}$及び$CaA\beta_{n-42}$を合成した．$A\beta_{1-42}$の凝集に対する$TxA\beta_{n-42}$の阻害効果を Th-T 法によって解析した．その結果，C 末端から 7 および 9 個のペプチド配列を有する$TxA\beta_{n-42}$ (n = 34, 36) は強力な凝集を阻害した． $A\beta_{1-42}$を神経細胞(SH-SY5Y)に添加してインキュベーションすると，神経細胞の増殖が阻害される．この系に$TxA\beta_{36-42}$を共存させて神経細胞毒性に対する影響を調べた．その結果，$TxA\beta_{36-42}$は$A\beta_{1-42}$よる神経細胞毒性をほぼ完全に抑制することがわかった(*Bioorg. Med. Chem.*, **24**, 4138-4143, 2016)． $CaA\beta_{n-42}$も強力な$A\beta_{1-42}$凝集阻害作用と神経細胞毒性抑制作用を示した(*Bioorg. Med. Chem. Lett.* **26**, 5468-5471, 2016)．これらの化合物は新しい AD 治療薬のシーズとなることが期待される．




**Scheme. High-affinity interaction between Tx(Ca) $A\beta_{n-42}$ and $A\beta_{1-42}$ inhibits $A\beta_{1-42}$ induced cell damage.**

Alzheimer's disease, amyloid ß, caffeic acid

発表責任者：福原　潔（fukuhara@pharm.showa-u.ac.jp）

講演番号：3C15a04
講演日時：3 月 19 日 10:05～ C 校舎 15 会場

ハモ骨抽出物に含まれるヒト白血病 T 細胞株 Jurkat 細胞増殖抑制物質の探索
*Muraenesox cinereus* showed the potential biological activity for Jurkat cell
○宮村 知弥[1]、祝 大知[2]、宇高 芳美[1]、住 慶太朗[3]、伊藤 智広[4]、北山 隆[1,2]（[1]近畿大院・農・バイオ、[2]近畿大・農・バイオ、[3]近畿大院・農・水産、[4]三重大・院・生物資源）
○Tomoya MIYAMURA[1], Daichi IWAI[2], Yoshimi UTAKA[1], Keitaro SUMI[3], Tomohiro ITOH[4], Takashi KITAYAMA[1,2] ([1]Major. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agric. Kindai Univ., [2]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agric. Kindai Univ., [3]Dept. Fish., Grad. Sch. Agric. Kindai Univ., [4]Dept. Life Sci., Grad. Sch. Bioresources Mie Univ.)

【緒言】
海洋生物であるハモは、その多くが食材として利用されているが、その加工工程で副産物として発生するハモ骨は一部出汁には利用されるものの、その多くが廃棄物として処理されている。魚骨には EPA や DHA などの高度不飽和脂肪酸が多く含まれており，これら脂肪酸は抗腫瘍作用を示すことが知られている。我々はハモ骨の新たな再利用法を検討するため、ヒト白血病 T 細胞株 Jurkat 細胞を用いて抗がん活性を検討したところ、ハモ骨の 80%エタノール抽出物が Jurkat 細胞に対し脂質過酸化反応誘導によるオートファジー細胞死を惹起することを明らかにした [1]。しかし，これまでにこのハモ骨の 80%エタノール抽出物に含まれるオートファジー細胞死を誘導する物質の同定に至っていない。そこで本研究では、このハモ骨 80%エタノール抽出物に含まれるオートファジー誘導物質の探索を試みた。

【結果】
水、あるいは水-エタノール混合溶液を用いた粉砕ハモ骨を抽出画分について Jurkat 細胞増殖抑制評価を行ったところ、80% エタノール水溶液抽出画分が強い効果を示すことが分かった。この粗抽出物をさらにシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し分画を進めたところ、比較的高極性部位に活性を示す物質が存在する可能性が示唆された。そこでさらにアセトニトリル、メタノール、エタノール、アセトン、ジクロロメタン、テトラヒドロフラン、酢酸エチル、ジエチルエーテル、ベンゼン、ヘキサンなど広範囲に亘る極性をもつ溶媒を用いたハモ骨抽出物について活性評価を行ったところ、比較的高極性のアセトニトリル、メタノール、そしてアセトン抽出物に強い活性が見られた。興味深いことにベンゼンやヘキサンなど、非極性溶媒抽出物からも強い活性が見いだされた。また酢酸エチルやジエチルエーテル抽出物にはほとんど活性は観測されなかった。
このように、高極性画分に Jurkat 細胞増殖抑制活性成分が存在することが示唆されたものの、広範囲に亘る極性画分で複数の活性成分が存在する可能性があるなど、興味深い知見が得られた。非極性側画分の単離にも成功し、これら成分と活性の関係についても検討している。

1. 住　慶太朗他、2016 年度日本水産学会春季大会　要旨集

*Muraenesox cinereus*, Jurkat cell, inhibitor

発表責任者：北山隆（kitayama@nara.kindai.ac.jp）

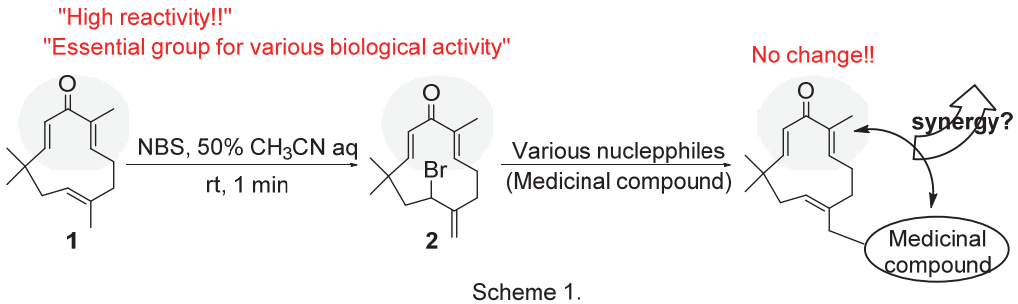
講演番号：3C15a05
講演日時：3 月 19 日 10:20～ C 校舎 15 会場

# 共役系保存型 zerumbone 誘導体を用いたヒト白血病 T 細胞株 Jurkat 細胞増殖抑制剤の開発

# Zerumbone-aliphatic acid complex showed the potential biological activity for Jurcat cell

宇高 芳美[2]、○藤原 裕子[1]、伊藤 智広[3]、北山 隆[1,2] ([1]近畿大・農・バイオ、[2]近畿大院・農・バイオ、[3]三重大・院・生物資源)
Yoshimi UTAKA[2], ○Yuko FUJIWARA[1], Tomohiro ITOH[3], Takashi KITAYAMA[1,2] ([1]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agric. Kindai Univ., [2]Major. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agric. Kindai Univ., [3]Dept. Life Sci., Grad. Sch. Bioresources Mie Univ.)

**【諸言】**ゼルンボン **1** は無色の斜方晶系針状結晶体で、特有の香りを持つ 11 員環セスキテルペンであり、環内に共役二重結合と孤立二重結合をもち、高い潜在的反応性をもつ。**1** は、野生のショウガであるハナショウガ(*Zingiber zerumbet Smith*)の根茎部に乾燥重量あたり 3-4%の高含有率で含まれ、水蒸気蒸留によって容易に単離・精製できる。また、ゼルンボンは抗炎症作用、抗癌活性、抗 HIV 活性などの生理活性を示すことが明らかとなっており、医薬品のリード化合物としても非常に興味深い物質である。これまでの我々の研究で、ゼルンボンは簡単な反応条件で劇的な骨格変換反応を示し、多様な骨格が得られることを明らかとした。[1] その多くが反応高活性な共役系での反応が中心であるが、NBS を用いたエキソオレフィン化後に求核試薬を付することによって、ゼルンボンの生理活性の発現に重要な役割を果たすと推測できる、共役カルボニル系を保持した反応系の開発に成功した(Sheme1)。[2] したがってゼルンボンをペンダントとしたペンダント型ゼルンボンは、カップリングするものによって、多様な生理活性を発現できる可能性があるため、創薬開発への応用が期待できる。
そこで本研究では抗がん作用や腹部大動脈瘤肥大細胞生成抑制作用など、多くの生理活性が報告されている EPA をはじめとする飽和および不飽和脂肪酸とゼルンボンの反応検討を行い、多くのペンダント型ゼルンボンの脂肪酸エステルを合成することに成功した。今回は生理活性評価の中で、ヒト白血病 T 細胞である Jurkat 細胞を用いた抑制結果についても報告する。
**【結果】**NBS 反応に続く求核反応で EPA をはじめとする様々な飽和・不飽和脂肪酸をナトリウム塩とし、ゼルンボンにカップリングさせた結果、目的の化合物が得られた。得られた化合物について、ヒト白血病 T 細胞である Jurkat 細胞を用いた生理活性評価を行ったところ、炭素数や不飽和度の違いによって活性に差が生じた。




Scheme 1.

1. Kitayama, T. et al. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2667–2672.
2. Kitayama, T. et al. *Tetrahedron*. **2013**, *69*,10152-10160.

zerumbone, Jurkat cell, inhibitor

発表責任者：北山隆（kitayama@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：3C15a06
講演日時：3 月 19 日 10:45～ C 校舎 15 会場

# 天然化合物由来の小胞体グルコシダーゼ II 阻害剤の構造展開とその誘導体の抗ウイルス活性
# Development of an ER glucosidase II inhibitor from natural compounds and its antiviral activity

○恩田 桃子[1]、氏家 誠[3]、袴田 航[1,2]、平野 貴子[1]、西尾 俊幸[1,2] ([1]日大生資科・生命化、[2]日大院生資科、[3]日獣大獣医)
○Momoko ONDA[1], Makoto UJIKE[3], Wataru HAKAMATA[1,2], Takako HIRANO[1], Toshiyuki NISHIO[1,2] ([1]Nihon Univ., [2]Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [3]Nippon Veterinary and Life Science Univ.)

【目的】近年、新興・再興ウイルス感染症が世界的な問題となっているが、ウイルス感染症に対する市販薬は少なく抗ウイルス剤は限られ、様々なウイルス感染症に対応可能な抗ウイルス剤が強く求められている。我々は、原因ウイルスの感染・増殖に必須なウイルスエンベロープの *N*-結合型糖鎖に着目した。そのなかでも *N*-結合型糖鎖プロセシングに関わる小胞体グルコシダーゼ II （以下 GII ）阻害剤は、ウイルス表面糖鎖を未成熟としウイルスの感染力を大幅に低下させると報告されているが、GII がウイルスの宿主であるヒトの酵素であり抗ウイルス薬の標的酵素として適切ではないとの懸念が多く示されていた。しかし現在では、標的酵素が関わるヒト細胞内でのウイルス特異的増殖プロセスの存在が明らかとなり（*Current Opinion in Pharmacology*, **30**, 1, 2016）、多くの懸念が払拭されるとともに、新たな抗ウイルス薬の作用標的として非常に注目を集めている。そこで、我々は新規かつ強力な GII 阻害剤見出し、抗ウイルス剤へ展開することを本研究の目的とした。

【方法】これまでに当研究室では、天然化合物ライブラリーから GII 阻害剤のスクリーニングを行ない、カルボリン誘導体（下図）が GII 阻害活性を有していることを初めて見出した。カルボリン母核は非糖ミミックな構造であり、構造活性相関を得るための合成展開が容易であり抗ウイルス剤の母核として適していると考えた。そこで本発表では、カルボリン誘導体の合成法の確立とそれに基づいた構造展開を行い、得られた誘導体の細胞レベルでの GII 阻害活性および細胞毒性の評価と抗ウイルス活性について評価を行った。

【結果】得られたカルボリン母核を有する阻害剤およびその誘導体のほとんどに合成法の報告がなかったため、トリプトファンより 3 工程で中間体を合成し、その後の 3 工程で各種誘導体を合成した。合成したカルボリン誘導体の GII 阻害活性は、我々が開発した GII 特異的蛍光基質を用いた培養細胞における GII 阻害アッセイ系により評価し、細胞毒性については WST-8 法を用いて評価を行い、抗ウイルス剤に求められる低毒性で GII 阻害活性の高い誘導体を選抜した。現在、コロナウイルスを用いてこれら誘導体の抗ウイルス活性の評価を行っている。今後は、これらの結果に基づいた構造活性相関を評価することより、新規誘導体の合成と生物活性の評価を行い、本誘導体の抗ウイルス剤への応用を目指していく。

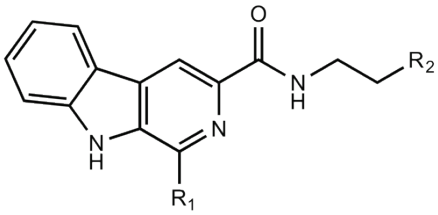


図　カルボリン母核

Glucosidase II, *N*-glycan, antivirus

発表責任者：袴田　航（hakamata.wataru@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3C15a07
講演日時：3 月 19 日 11:00～ C 校舎 15 会場

*N*-結合型糖鎖修飾に関与する小胞体グルコシダーゼ II 阻害剤の合成と生物活性評価：抗ウイルス剤への応用を目指して

Synthesis of inhibitor against ER glucosidase II involved in *N*-glycan processing process and evaluation of its biological activity

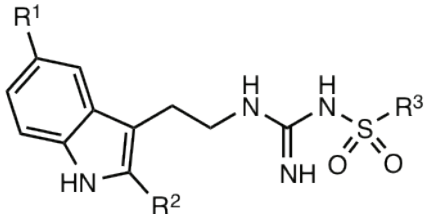
○上間 駿[1]、朝日 孝幸[2]、氏家 誠[3]、田代 充[4]、袴田 航[1,2]、平野 貴子[2]、西尾 俊幸[1,2] ([1]日大院生資科、[2]日大生資科、[3]日獣大獣医、[4]明星大理工)

○Shun Uema[1], Takayuki Asahi[2], Makoto Ujike[3], Mitsuru Tashiro[4], Wataru Hakamata[1,2], Takako Hirano[2], Toshiyuki Nishio[1,2] ([1]Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [2]Nihon Univ., [3]Nippon Veterinary and Life Science Univ., [4]Meisei Univ.)

【目的】現在、人や家畜へのウイルス感染症が大きな社会問題となっている。しかし、これらのウイルス感染症に対する抗ウイルス薬の開発は十分ではない。そこで我々は、ウイルスコートタンパク質の糖鎖合成の阻害がウイルスの感染力を大幅に低下させることに着目し、糖鎖合成の初期段階を司る小胞体グルコシダーゼ II (GII) を標的酵素とした。これまでに我々は、GII と同じ GH family 31 に属する *S. solfataricus* 由来 α-glucosidase (PDB ID: 2G3N) をテンプレートとし、ドラックライクな化合物ライブラリからのリガンドの仮想スクリーニング (W. Hakamata et al, *Bioorg, Med Chem. Lett.*, **22**, 62, 2012) により、リガンドとしてインドールスルフォンアミド誘導体（右下図）を得た。そこで、これら誘導体の合成法の確立と構造展開・生物活性の評価・抗ウイルス活性について研究を行い、*N*-結合型糖鎖をもつウイルスに対して抗ウイルス薬の開発を目指して研究を行っている。

【方法・結果】リガンドとして得られたインドールスルフォンアミド誘導体の生理作用および構造活性相関を明らかにするために様々な誘導体の合成が必要となるが、合成法は報告されていなかった。そこで、トリプタミンを出発原料として、末端のアミノ基に Boc 基で保護したグアニジノ基を導入した。次に Boc 基を脱保護しグアニジノ基とした後に、様々な置換基を有するスルフォン酸クロリドと反応させることで、様々な置換基を有する誘導体の合成に成功した。これら誘導体は、イミン–エナミン互変異性体に基づく多くの配座異性体を持つため、NMR による構造解析が困難であったが 40 °C において各種 NMR を測定することによって構造を決定することができた。

合成したこれら誘導体を抗ウイルス剤へと応用するためには、化合物の細胞毒性が低い必要があるため、細胞毒性を WST-8 法を用いて評価し細胞毒性の低い化合物を選抜した。選抜した低毒性化合物のセルベースでの GII 阻害活性を、我々が開発した GII 特異的蛍光基質を用いて評価した。その結果、GII 阻害活性が高い化合物として、$R^1$=H, $R^2$=H, $R^3$=*p*-tolyl ($EC_{50}$ = 78.4 μM) と $R^1$=F, $R^2$=$CH_3$, $R^3$=Ph ($EC_{50}$ = 74.0 μM) を有する２つの化合物を得た。現在は、これら２つの GII 阻害剤を含め、合成して得られたすべての誘導体のコロナウイルス（MASR・SARS などもコロナウイルス）に対する抗ウイルス活性を評価している。



図．インドールスルフォンアミド誘導体

glucosidase, inhibitor, antiviral drug

発表責任者：袴田 航（hakamata.wataru@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3C15a08
講演日時：3 月 19 日 11:15～ C 校舎 15 会場

# 糸状菌代謝産物 ovalicin は赤痢アメーバ症肝膿瘍モデルハムスターに対して治療効果を示す

# Ovalicin, a fungal metabolite, is effective against a hamster amoebic liver abscess model.

○森 美穂子[1,2]、中野 由美子[3]、柘植 聡志[1,2]、大村 智[2]、塩見 和朗[1,2]、野崎 智義[3,4] ([1]北里大院感染制御、[2]北里生命研、[3]感染研、[4]筑波大院生命環境)
○Mihoko MORI[1,2], Yumiko NAKANO[3], Satoshi TSUGE[1,2], Satoshi OMURA[2], Kazuro SHIOMI[1,2], Tomoyoshi NOZAKI[3,4] ([1]Kitasato Univ., [2]Kitasato Institute for Life Sciences, [3]NIID, [4]Tsukuba Univ.)

【背景・目的】赤痢アメーバ症は単細胞の寄生虫（原虫）である赤痢アメーバ（*Entamoeba histolytica*）が腸管に寄生して起こる下痢症である。赤痢アメーバが肝臓、肺、脳へ移行して膿瘍を形成し、重症化するケースもある。発展途上国を中心に罹患者は 5,000 万人、死者は原虫症の中ではマラリアに次いで多く、年 10 万人と推定されている。日本でも感染症法により届出が必要な寄生虫症であり、近年報告数が増加している。赤痢アメーバ症の治療には抗菌・抗原虫薬であるメトロニダゾールが用いられているが、耐性を持つ赤痢アメーバの出現、催奇形性などの副作用があること、感染に関与するシスト状態の赤痢アメーバには効果がないこと等のため、新しい治療薬が求められている。

我々は新たな赤痢アメーバ症治療薬のシーズ化合物を微生物二次代謝産物より探索している。約 7,000 種の放線菌培養液および糸状菌培養液から、赤痢アメーバ原虫に対し殺原虫活性を示した *Penicillium* 属糸状菌培養液と *Metarhizium* 属糸状菌培養液を選択し、前者から血管新生阻害活性を持つことで知られる fumagillin、後者からその類縁化合物 ovalicin を殺原虫化合物として単離した（2016 年度大会で報告）。Fumagillin は抗微胞子虫症治療薬として使用されており、抗赤痢アメーバ活性も既に報告されているが、ovalicin の抗赤痢アメーバ活性は初の知見であった。

我々の測定結果では、*in vitro* において ovalicin の方がより低濃度で抗赤痢アメーバ活性を示し、ヒト正常細胞に対する細胞毒性との選択性が見られたため、ovalicin は創薬シーズとして大きな可能性を持つ化合物だと考えられた。そのため肝膿瘍モデルハムスターを用い、ovalicin の *in vivo* での活性を調べた。

【方法】Fumagillin は市販のものを購入し使用した。Ovalicin は *Metarhizium* 属糸状菌 FKI-6809 株を培養し、培養液を酢酸エチル抽出後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、分取 HPLC で精製して得た。それぞれ DMSO で溶解し、ハムスターに皮下または経口により投与した。ハムスターは赤痢アメーバの栄養型を注射して感染させ、感染 24 時間後から化合物を投与し、感染 6 日後に肝膿瘍の状態を確認した。

【結果】Fumagillin は 5 mg/kg で皮下投与、経口投与のいずれでも治療効果は見られなかった。Ovalicin は経口投与では治療効果は全く見られなかったが、皮下投与では既存薬メトロニダゾール 10 mg/kg（経口投与）に匹敵する治療効果を 1 mg/kg で示した。この結果から ovalicin は赤痢アメーバ症治療薬シーズとして展開する価値のある化合物であると考えられた。

*Entamoeba histolytica*, ovalicin, amoebic liver abscess

講演番号：3C15a09
講演日時：3 月 19 日 11:30～ C 校舎 15 会場

# 抗がん剤への応用を目指した新規ゴルジ体マンノシダーゼ阻害剤の探索と評価

# Screening and evaluation of novel Golgi mannosidase inhibitors for anticancer agents.

○小山 亮祐[1]、袴田 航[1,2]、平野 貴子[2]、西尾 俊幸[1,2] ([1]日大院生資化、[2]日大生資化・生命化)
○ Ryosuke KOYAMA[1], Wataru HAKAMATA[1,2], Hirano TAKAKO[2], Toshiyuki NISHIO[1,2] ([1]Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [2]Chem. and Life Sci., College of Bioresource Sciences. Nihon Univ.)

【目的】タンパク質の *N*-結合型糖鎖プロセシングに関与するゴルジ体マンノシダーゼ I（GMI）の阻害は、抗がん活性や抗ウィルス活性等の様々な生理作用を示す。これは GMI の阻害によって成熟を阻害された糖鎖が未成熟のまま輸送されるによるところが大きいと考えられる。しかし、既知 GMI 阻害剤として汎用されているデオキシマンノジリマイシンやその誘導体を用いた生理作用の研究では、高い作用濃度が必要となるために、詳細な生理作用の解析を困難としている。本問題に対して既知阻害剤の構造展開（*Org. Lett*. **17**, 3662, 2015）に解決を委ねる報告も多く見られるが、糖ミミックな構造である限り生体膜透過性・不斉中心の数・構造展開の困難さ等を回避できないと考え、非糖ミミックな GMI 阻害剤を得ることを本研究の目的とした。

【方法および結果】これまでに当研究室では、理化学研究所天然化合物ライブラリより新規 GMI 阻害剤として、非糖ミミックな化合物を見出し AR500 シリーズ（図）と命名した。そこで、AR500 シリーズ 13 化合物に対してセルベースでの GMI 阻害活性を検討した結果、8 個の化合物が $EC_{50}$ 1 μM 以下と高い GMI 阻害活性を示した。さらに、抗がん活性の指標としての細胞毒性を WST-8 法にて検討した結果、5 個の化合物が $CC_{50}$ 10 μM 以下の活性を示した。そこで、これらの化合物の GMI 阻害活性と細胞障害性の関係を明らかにするために、既知 GMI 阻害剤と AR500 シリーズ阻害剤で細胞を処理した。GMI が阻害されれば細胞内にハイマンノース糖鎖が蓄積するため、蓄積した糖鎖を蛍光染色レクチンにより検出し、蛍光の細胞内局在の観察を行った。その結果、通常主にゴルジ体に蓄積するハイマンノース糖鎖が GMI 阻害剤添加時には、細胞内に広く蛍光が観察された。このことは、GMI 阻害により細胞内にハイマンノース糖鎖が蓄積されていることを示している。さらに、GMI 阻害により細胞表層にハイマンノース糖鎖が輸送されると細胞が接着不全を引き起こすことから、両阻害剤処理後の細胞の形態観察を行った。その結果、処理後細胞に接着不全による形態変化が観察できた。このことは、GMI 阻害により蓄積したハイマンノース糖鎖が細胞表面まで輸送されていることを示している。以上をまとめると、天然化合物由来の AR500 シリーズが既知阻害剤と同様の作用機序を持ち、かつ低濃度で作用する非糖ミミックな GMI 阻害剤であることが明らかとなった。

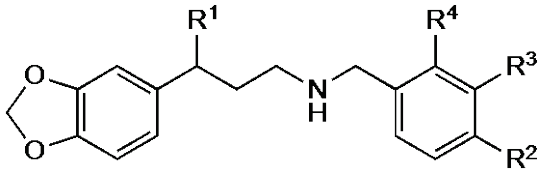


図. AR500 シリーズ母核

Golgi mannosidase, inhibitor, anticancer agent

発表責任者：袴田　航（hakamata.wataru@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3C15a10
講演日時：3 月 19 日 11:45～ C 校舎 15 会場

5,6-Dehydrokawain 誘導体の合成と破骨細胞分化抑制作用
Synthesis of 5,6-dehydrokawain analogs and their osteclast differentiation inhibitory activity
○熊谷 百慶[1,2]、西川 慶祐[2]、三嶋 隆[1]、吉田 泉[1]、井出 将博[1]、小泉 慶子[1]、中村 宗知[1]、森本 善樹[2] ([1]日本食品分析センター、[2]大阪市大院理)
○Momochika KUMAGAI[1,2], Keisuke NISHIKAWA[2], Takashi MISHIMA[1], Izumi YOSHIDA[1], Masahiro IDE[1], Keiko KOIZUMI[1], Munetomo NAKAMURA[1], Yoshiki MORIMOTO[2] ([1]Japan Food Research Laboratories, [2]Osaka City Univ.)

【目的】骨粗鬆症は骨強度低下によって骨折の危険性が高まった病態であり、その治療および予防は健全な長寿社会を実現するために不可欠である。骨粗鬆症の病態は、骨形成を凌駕する骨吸収が持続することによる骨量の減少が主体であり、その治療薬として骨形成を担う骨芽細胞の分化を促進する化合物および骨吸収を担う破骨細胞の分化を抑制する化合物の探索が望まれている。我々は、先行研究において、沖縄地方で親しまれている機能性食品素材である月桃(*Alpinia Zerumbet*)に含まれるスチリルピロン、5,6-dehydrokawain(DK)にマウス頭蓋冠由来骨芽前駆細胞 MC3T3-E1 細胞の分化促進作用を見出した[1)]。さらに DK の構造を変換した新規誘導体を種々合成し、その活性を高めることに成功している[2)]。本研究では、それら新規誘導体を含む 20 種の DK 誘導体についてさらに破骨細胞に対する分化抑制効果があるかを検討した。
【方法と結果】マウスマクロファージ様細胞株 RAW264 細胞を培養プレートに播種し、1 日後各ウェルに 10 ng/mL　RANKL および各サンプルを添加してさらに 3-4 日間培養した。培養後、破骨細胞への分化抑制効果を酒石酸耐性フォスファターゼ(TRAP)活性を測定することにより調べた。合成品の DK は、以前我々が月桃から単離した天然 DK について報告したとおり[1)]、10-20 μM の濃度において TRAP 活性を抑制しなかった。一方、新規 DK 類縁体の 6-[(*E*)-2-(4-Ethylphenyl)vinyl]-4-methoxy-2*H*-pyran-2-one および 6-[(*E*)-2-(4-Butylphenyl)vinyl]-4-methoxy-2*H*-pyran-2-one は、10 μM および 20 μM において濃度依存的に破骨細胞への分化を抑制した。また、TRAP 陽性多核細胞形成も、これらの新規誘導体の添加により抑制された。これらの新規 DK 類縁体は、10-30 μM の濃度において骨芽細胞の分化を促進することを明らかにしており[2)]、骨芽細胞への分化促進作用と破骨細胞への分化抑制作用を併せ持つ、骨粗鬆症の予防に有効な化合物である可能性が示唆された。
またその他にも、破骨細胞の分化を 10 μM 以下の濃度で抑制する新たな DK 類縁体を見出した。現在、本化合物についてその作用機序解明を進めている。

(1) Kumagai, M. *et al. Biosci. Biotech. Biochem.* **2016**, *80*, 1425.
(2) 熊谷ら、第 58 回天然有機化合物討論会講演要旨集, **2016**, 521-526.

osteoclast, 5,6-dehydrokawain

発表責任者：熊谷百慶（kumagaim@jfrl.or.jp）

講演番号：3C15p01
講演日時：3 月 19 日 14:00～ C 校舎 15 会場

# 京都独自の乳酸菌ライブラリーの構築と機能解析

# Construction and characterization of the library of lactic acid bacteria originally isolated in Kyoto

○和田 潤、泊 直宏、高阪 千尋、清野 珠美、廣岡 青央、山本 佳宏（京都市産技研）
○Jun Wada, Naohiro Tomari, Chihiro Kohsaka, Tamami Kiyono, Kiyoo Hirooka, Yoshihiro Yamamoto (KITC)

【背景および目的】我々の生活のまわりには多くの発酵食品が存在しており、ヨーグルトや漬物など、様々な発酵食品に用いられる乳酸菌は我々にとって非常に馴染みがある存在であり、安心なものである。近年、乳酸菌はプロバイオティクス（ヒトの健康に好影響を与える生細菌）としても注目を集めている。

古くから京都では微生物の力を借りてつくられた多くの発酵食品（飲料含む）が市場に出回っている。これら発酵食品の発酵過程の主役は微生物であり、当然のことながら、微生物が製品の出来や品質を大きく左右する。良い発酵食品もしくは商品化のコンセプトに合致した製品製造を可能にするためには、適した性能を有した微生物を用いる必要がある。そこで、良い発酵食品等を作るために必要な良い微生物を提供する目的で、様々な発酵食品に用いられる乳酸菌の単離および収集を行うこととし、研究所オリジナルの多様で特徴ある乳酸菌のコレクション、即ち、乳酸菌ライブラリーの構築を目指すこととした。また、ライブラリー中の代表的な乳酸菌に対してその諸性質を調べることとした。

【方法および結果】乳酸菌を単離するための培養は、最初にロゴサ寒天培地を用いた後、MRS 寒天培地を用いて数回画線を行って菌を単一にした。BCP 加プレートカウントアガールを用いて酸の生成を確認した後、顕微鏡で細菌であることを確認した。主に京都市内で製造・販売されている発酵食品などから乳酸菌を単離し、グリセロールストックとして -80℃ に保管した。本乳酸菌ライブラリーは現在 400 株以上の乳酸菌によって構成されている。

本乳酸菌ライブラリーの中から代表的な菌株 150 株以上に対して数種の培地を用いて生育性試験を行ったところ、それぞれ異なった生育性を示したことから、本研究の単離工程で多様な菌株が取得できたことが示唆された。また、顕微鏡観察から乳酸桿菌、乳酸球菌ともに取得できたことがわかった。さらに、京都は有数の酒どころであることから、酒母製造に利用可能な乳酸菌を選抜する目的で、本乳酸菌ライブラリーを用いて生育性試験や代謝成分の分析を行ったところ、適性が示唆される菌株を選抜できた。特徴的な性質を示した乳酸菌に対して細菌の指紋領域である 16S rRNA 遺伝子の配列情報の一部を決定することによって菌株の簡易同定を行ったところ、近縁種と推定される菌株間でも性質が異なることが分かった。菌株ライブラリーは多様で充実していることが望まれるため、有用株の選抜とともに今後も継続して本乳酸菌ライブラリーの更なる充実化を目指す。

lactic acid bacteria, isolation, fermented food

発表責任者：和田潤（jwada@tc-kyoto.or.jp）

講演番号：3C15p02
講演日時：3 月 19 日 14:15～ C 校舎 15 会場

植物からの酵母の分離と食品への利用特性について
Separation of yeast from plants and characteristics of its application to food
○片山 海、成澤 直規、森永 康、竹永 章生（日大院・生資科）
○Kai KATAYAMA, Naoki NARISAWA, Yasushi MORINAGA, Fumio TAKENAGA (Nihon Univ.)

【背景・目的】近年、酒類やパンでは製品に付加価値を付けるため自然界から分離した酵母を利用する例が報告されているが、日本国内の *Saccharomyces cerevisiae* を含む各種酵母の生態分布に関する報告や食品製造を想定した特徴づけに関する報告は少ない。本研究では、本学キャンパス内で採取した植物から集積培養法にて各種酵母を分離し、生態分布調査と食品製造への利用適性を評価した。
【方法】平成 26、27 年度で本学キャンパス内よりサクラとバラを中心に 1,027 の植物試料を採取し、25 ml の集積培地（麹汁培地+エタノール 40 ml/L+クロラムフェニコール 100 ppm+プロピオン酸ナトリウム 1 g/L）で 10 日間、培養した。白濁した沈殿物や発泡が生じた培養液を選択培地（YPD+エタノール 40 ml/L+クロラムフェニコール 100 ppm+プロピオン酸ナトリウム 1 g/L）に画線して単一コロニーを分離した。分離株の解析は、rRNA 遺伝子(ITS1-5.8S-ITS4)の領域長の解析、10%グルコース YPD 培地でのアルコール生産能試験、rRNA 遺伝子（26S D1/D2）の解析による属・種の同定を行い、トランスポゾン Ty1 の末端繰り返し配列等のパターンから系統樹を作成した。食品への利用適性試験は各種糖の発酵能や亜硫酸耐性、低 pH 条件下、濃糖条件下、高塩濃度条件下などの生育試験を行った。
【結果・考察】1,027 の植物試料よりサクラ（花）470、サクラ（落花）59、バラ（花）288、バラ（落花）47、その他 163 サンプルを集積培養に供した。このうち、沈殿・発泡した試料はサクラ（花）67、サクラ（落花）25 、バラ（花）103、バラ（落花）39 、その他 81 本であった。これらの集積培養液 315 本を選択培地に画線し 360 株を酵母候補株とした。rRNA 遺伝子(ITS1-5.8S-ITS4)の分類では 300-499 bp が約 17%、500-699 bp が約 35%、700-899 bp が約 40%であった。アルコール生産能試験で 360 株中約 80%がアルコール濃度 2.00%未満を示し、アルコール濃度 2.00-3.99%は約 18%、4.00%以上を示す株は約 2%であったため、酵母候補株に 2%未満のアルコール生産能を有する各種酵母の存在が示唆された。rRNA 遺伝子（26S D1/D2）のシーケンス解析は 41 株が解析済みで、*S. cerevisiae* 12 株、*Torulaspora delbrueckii* 8 株、*Schizosaccharomyces japonicus* 3 株、*Meyerozyma guilliermondii* 2 株、*Pichia fermentans* 6 株、*Clavispora lusitaniae* 3 株、*Geotrichum candidum* 4 株、*Candida akabanensis* 1 株、*Kluyveromyces marxianum* 1 株、*Candida homilentoma* 1 株と同定された。*S. cerevisiae* 9 株の遺伝子多様性と食品への利用適性を調べた結果、株間に遺伝的差異が認められたが、いずれもグルコース、フルクトース、スクロースの発酵能を示し、マルトース発酵能は示さず、亜硫酸 50-125 ppm（ワイン醪の添加濃度）グルコース 10%-50%、pH4.0-3.0 で生育を示した。

wild yeast, yeast isolation, yeast characterization

発表責任者：成澤　直規（narisawa.naoki@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3C15p03
講演日時：3 月 19 日 14:30～ C 校舎 15 会場

# 新奇ケルセチン代謝性腸内細菌 Bacterium N4-2 のヒト糞便からの分離

# Isolation of a novel quercetin metabolizing bacterium N4-2 from human feces

○田村 基[1]、松尾 洋輔[1]、中川 博之[1]、寺尾 純二[2] ([1]農研機構食品研究部門、[2]甲南女子大学)
○Motoi Tamura[1], Yosuke Matsuo[1], Hiroyuki Nakagawa[1], Junji Terao[2] ([1]Food Research Institute, NARO, [2]Konan Women's Univ)

［目的］　腸内には数多くの腸内細菌が存在するが、腸内細菌の個々の機能については不明な点が多い。そこで、ヒト糞便からケルセチン代謝性腸内細菌の分離を試み、ケルセチンの代謝・分解性について検討した。

［方法］試験 1.　健常人から提供を受けた糞便サンプルを嫌気性液体培地で希釈し、ケルセチンを添加して 37℃で 24 時間嫌気培養した。その後培養液を希釈し、変法 GAM 平板培地に塗抹し培養した。分離した種々のコロニーをケルセチンを含む嫌気性条件下で培養し、ケルセチンの代謝・分解性を検討し、ケルセチン高分解性 Bacterium N4-2 を取得した。さらに、Bacterium N4-2 とケルセチンの培養液にゲニステインやレスベラトロールを添加し、Bacterium N4-2 のケルセチン代謝に及ぼす影響を検討した。

試験 2.　健常人から提供を受けた糞便サンプルを嫌気性液体培地で希釈し、ケルセチンもしくは、ケルセチンとレスベラトロールを加えて 37℃で 7 時間嫌気培養を行った。培養終了後に培養液中のケルセチン濃度を測定した。

［結果と考察］16SrRNA 遺伝子の解析結果からケルセチン高分解性腸内細菌 Bacterium N4-2 は、*Fusobacterium varium* と 99%の相同性を有していた。Bacterium N4-2 は、嫌気培養 24 時間以内にケルセチンのほとんどを分解した。一方、対照株として使用した、*Fusobacterium varium* JCM 6320$^{T}$ のケルセチン代謝性は低かった。Bacterium N4-2 によるケルセチンの分解はゲニステインによる分解抑制は受けなかったが、レスベラトロールにより抑制された。ヒト糞便希釈液をケルセチンと培養した場合も、レスベラトロール存在下では、ケルセチン分解は抑制された。以上の知見から、レスベラトロールが腸内菌叢のケルセチン分解を抑制する可能性が示唆された。

Quercetin, bacterium, microbiota

発表責任者：田村基（motoita@affrc.go.jp）

講演番号：3C15p04
講演日時：3 月 19 日 14:45～ C 校舎 15 会場

ヒト腸内からの新規微生物の分離とバイオリソース整備
Isolation of yet-uncultured microorganisms from the human gut and maintenance of microbial resources
○坂本 光央[1,2]、飯野 隆夫[1]、大熊 盛也[1]（[1]理研 BRC-JCM、[2]日本医療研究開発機構, PRIME）
○Mitsuo SAKAMOTO[1,2], Takao IINO[1], Moriya OHKUMA[1]（[1]RIKEN BRC-JCM, [2]PRIME, AMED）

【目的】
近年の次世代シークエンサーを用いたメタゲノム的アプローチにより、培養を介さずにヒト腸内の微生物叢の把握およびその機能を容易に理解できるようになってきた。しかし、メタゲノム的アプローチにより検出されたヒト腸内の微生物のその多くがこれまでに未培養あるいは未同定の微生物（難培養微生物）である。ヒト常在微生物の研究をこれまで以上に発展させるためには、難培養性の微生物を種毎に分離培養し、微生物の本質を理解することが重要である。また、単離された微生物の分類学的研究を行い、その微生物に学名を与え、研究者間でその標的とする微生物に制限なくアクセスできる環境が必要である。本研究では、ヒト腸内から難培養性の微生物を単離し、その分類学的研究を行うとともに、微生物資源の確保およびその利用の観点からバイオリソースの整備を行うことを目的とした。
【方法】
健常成人 3 名の糞便から種々の血液寒天培地などを用いて菌株を分離した。また、メンブランフィルター法（Tanaka & Benno, Microbiol. Immunol., 2015）の適用も試みた。分離された菌株の 16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列を決定し、その配列の比較から既知種あるいは新菌種であるかを判定した。
【結果】
*Bacteroides* 属や *Bifidobacterium* 属に属する菌種も数多く分離されたが、近年、宿主との健康の関連性について注目されている *Akkermansia muciniphila* のような既知種ではあるがユニークな菌種も分離された。該当菌株は理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室（JCM）に寄託し、バイオリソースの整備を行った。また、16S rRNA 遺伝子配列の類似度の比較から新菌種であると考えられる菌株も分離され、現在詳細な検討を行っている。
本研究は公益財団法人発酵研究所（IFO）の平成 27 年度一般研究助成およびまたその一部は国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）が実施する平成 28 年度革新的先端研究開発支援事業「微生物叢と宿主の相互作用・共生の理解と、それに基づく疾患発症のメカニズム解明」の PRIME の支援によって行われた。

*Akkermansia muciniphila*, Intestinal microbiota, Yet-uncultured microorganisms

発表責任者：坂本 光央（sakamoto@riken.jp）

講演番号：3C15p05
講演日時：3 月 19 日 15:00～ C 校舎 15 会場

超微小土壌細菌の単離および生化学的解析
Isolation and biochemical analysis of soil ultramicroorganism
○堀内 希恵[1]、山中 茂[2]、志田 敏夫[1]([1]信大院繊・応生、[2]信大)
○Kie HORIUCHI[1], Shigeru YAMANAKA[2], Toshio SHIDA[1] ([1]Div. Appl. Biol., Grad. Sch. Sci & Tech., Shinshu Univ., [2]Shinshu Univ.)

【目的】
土壌 1 グラムには $10^9$ 個オーダーの原核生物がいて、種の数はおよそ 10,000 のオーダーであると推定されている。その中には優先種と希少種の微生物が存在し、その多くの微生物が難培養微生物であると考えられている。今日、命名されている微生物はたった 5,000 種ほどである。培養が難しい微生物を培養するには、初期培養や環境の維持が極めて重要である。このような細菌を培養できるようになれば、新たな遺伝子資源を得られるだけではなく、新規抗生物質などの有用な物質が得られる可能性がある。
本研究では信州大学繊維学部農場の土壌から採取した超微小細菌の D-1 株と R-1 株の諸性質について報告する。超微小細菌とは細胞サイズが 0.3 μm$^3$ 以下の微小な細菌であり、孔径が 0.45 μm の滅菌用のフィルターを通過する菌体である。超微小細菌の多くが難培養微生物であると思われ、それらに関する文献がほとんどないことが現状である。細胞サイズが通常の細菌より小さい超微小土壌細菌の生存戦略や他の微生物との共生関係などを明らかにするために、超微小土壌細菌が生産する代謝産物や酵素などについて調べる。
【方法・結果】
農場の土壌の懸濁液上清を 0.45 μm の滅菌用フィルターでろ過した。ろ液を貧栄養の液体培地に植菌し、外部から栄養源の添加をせずに連続集積培養した。得られた培養液を寒天培地に塗布し、出現したコロニーを再度フィルターろ過し、培養した。最終的に富栄養の液体培地で培養しても確実にフィルターを通過した 2 菌体（D-1 株、R-1 株）を微生物サンプルとした。
2 菌体について、16S rRNA シークエンスを行い、得られた DNA 配列をもとに近縁種を特定した。D-1 株は *Lysinimonas kribbensis* と、R-1 株は *Ferrovibrio denitrificans* と高い相同性を示した。近縁種に基づき、新種提唱のための登録を行った。得られた菌体の特徴（SEM による形態観察、TEM による形態観察およびベン毛の観察、代謝産物、分泌酵素、G+C 含量、抗生物質耐性など）を調べた。細菌の大きさは D 株が約 0.38×1.27 μm、R 株が約 0.40×1.03 μm である。体積は、D-1 株は約 0.14 μm$^3$、R-1 株は約 0.13 μm$^3$ である。菌体の体積を大腸菌と比較すると、ともに約 5 分の 1 であることがわかった。両菌株の有用性を検討するために、窒素固定能や鉄酸化能などについて調査している。

ultramicrobacteria, soil bacteria, 16S rRNA

発表責任者：堀内希恵（16fs719d@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3C15p06
講演日時：3 月 19 日 15:25～ C 校舎 15 会場

遺伝子検出法を用いた動物腸管由来運動性 *Lactobacillus* 属細菌の探索
PCR-based detection of motile lactobacilli in animal feces.
○藤田 公紀[1]、横田 健治[2]、五十君 靜信[2]、梶川 揚申[2] ([1]東農大院・農化、[2]東農大・生応化)
○Koki HUJITA[1], Kenji YOKOTA[2], Shizunobu IGIMI[2], Akinobu KAJIKAWA[2] ([1]Biol. Chem,Tokyo Univ. Agr., [2]Dept. Appl. Biol. Chem,Tokyo Univ. Agr.)

【背景・目的】*Lactobacillus* 属細菌の一部は多種多様な動物腸管から分離されている乳酸菌であり、腸管内共生細菌として知られている。一般的に *Lactobacillus* 属細菌は運動性を示さないとされているが、稀にべん毛を持ち運動性を示すものがいる。運動性は動物腸管内での生存に必須ではないものの、何らかの優位性を付与すると思われるが、運動性 *Lactobacillus* 属細菌の生態は明らかにされていない。また、運動性 *Lactobacillus* 属細菌の分離例は少なく、どのような動物種の腸管に共生しているかもほとんど知られていない。運動性 *Lactobacillus* 属細菌を検出・分離し、それらの分布域を調べることは、当該生物の生態を知る上で重要な知見となる。しかし、既存の実験手法によって運動性 *Lactobacillus* 属細菌のみを選択的に分離することは難しく、効率の良い分離法の確立が必要である。よって本研究では、PCR による特異的検出法と軟寒天による運動性細菌の選択的な分離方法を検討し、運動性 *Lactobacillus* 属細菌が生息する動物を調査することを目的とした。
【方法・結果】運動性 *Lactobacillus* 属細菌が持つ既知の運動性関連遺伝子配列をアライメントし、最も保存性の高い *fliG* に特異的なユニバーサルプライマーを作製した。このプライマーを用いて、動物糞便サンプルから抽出した DNA を鋳型とした PCR を行い、運動性 *Lactobacillus* 属細菌の検出を試みた。一方、糞便サンプルから運動性細菌を選択的に分離する方法としては、0.15% Agar MRS 軟寒天培地を用いた。軟寒天培地に PBS で懸濁した糞便サンプルを穿刺し、運動性により培地中に拡散した菌体を純化した。これまでに 48 種の動物糞便から運動性 *Lactobacillus* 属細菌の検出及び分離を行った結果、既知のニワトリやウマに加え、新たにクロレムール、リスザル、ラマなど 11 種の動物から計 37 株の *Lactobacillus agilis* 及び 2 株の *Lactobacillus ruminis* を分離することが出来た。このことから、*L. agilis* は、ごく一部の動物に限らず多様な動物の腸管に共生していることが示唆された。また、運動性 *Lactobacillus* 属細菌を分離できなかった糞便サンプルの一部において *fliG* 特異的 PCR 産物が得られ、シーケンス解析及び相同性検索の結果、*Lactobacillus agilis* と推定された。この結果は、PCR による遺伝子検出法を併用することで、分離法による検出効率の低さを補うことができると考えられた。現在、新たなサンプルの収集及び運動性 *Lactobacillus* 属細菌の存在が推定されたサンプルの再収集を行い、引き続き運動性 *Lactobacillus* 属細菌を探索している。さらに、分離した運動性 *Lactobacillus* 属細菌については、運動性関連遺伝子における系統解析を試みる予定である。

motile lactobacilli, isolation, PCR-based detection

講演番号：3C15p07
講演日時：3 月 19 日 15:40～ C 校舎 15 会場

# 循環型汚水浄化槽内の細菌叢遷移とアミノ酸代謝系の解析

# Dynamics of the bacterial community composition and analyses of amino acid metabolism system in the lab-scale wastewater treatment system

○日下 みのり、増子 幸佑、有見 芳樹、鈴木 智順（東理大 応生）
○Minori KUSAKA, Kosuke MASUKO, Yoshiki ARIMI, Tomonori SUZUKI (Department of Applied Biological Science, Tokyo University of Science)

【目的】　水質浄化において窒素やリンの挙動、難分解性物質など特定の物質の分解機構は盛んに研究されているが、普遍的な微生物活動である易分解性有機物の分解に関わる細菌の種類や分解機構は十分に解明されていない。本研究では、普遍的な有機物分解反応の解明を目的として、複合微生物系におけるタンパク質の代謝に着目した。具体的には、易分解性有機物の分解に関わる細菌とタンパク質の分解過程で生じるアミノ酸などを解析することを目的としている。

【方法】　有機物分解過程を細菌叢、水質の両面でモニタリングが可能なラボスケールの循環型汚水浄化装置を構築した。これはスポンジを担体とした好気槽、嫌気槽からなり、好気・嫌気的な逐次的反応系を持つ装置である。この装置に生活排水を模した人工汚水を循環させ、装置内の担体に定着させた微生物群により有機物の分解を行っている。人工汚水を投入した時点から経過時間毎に細菌叢と水質の変化を追った。細菌群集構造解析のため、16S rDNA-PCR-DGGE 法を行った。また、タンパク質分解に伴うアミノ酸の代謝を解析するため、qPCR 法を行った。さらに、タンパク質分解によって生じるアミノ酸の代謝過程を解析するため、各種酵素活性（aspartate aminotransferase, glutamate dehydrogenase）の測定、水質項目として TOC、pH、タンパク質量、アンモニア態窒素量をそれぞれ測定した。

【結果】　前任者の結果より、装置内には *Bacteroidetes* 門、*Alcaligenes* 属、*Firmicutes* 門に属する細菌が恒常的に定着しており、有機物分解に積極的に関与すると考えられるものが *Bacteroidetes* 門、*Firmicutes* 門に属する細菌であったことが確認されている。また、総プロテアーゼ活性が 2 度のピークを示したことに対して、TOC は 6 h でピークがみられた後に減少傾向を示したということが確認されていることから、有機物の分解過程は合成と分解による顕著なタンパク質の増減が繰り返されて進行すると考えられる。今回、従来のプロテアーゼ活性ではなくタンパク質分解によって生じるアミノ酸の代謝過程に着目したところ、一度目のモニタリング実験では、各種酵素活性で経過時間ごとに異なったピークが確認された。二度目のモニタリング実験では、各種酵素活性に加え、さまざまな水質項目の測定を同時に行うことでその関連性を確認すると共に、細菌叢の変化を追った。前任者の結果より、タンパク質量の変化の挙動とプロテアーゼ活性の挙動が一致しないことが確認されていることから、アミノ酸においても代謝と合成が並行で行われており、さらに各反応に伴い細菌叢の変化がみられることが予想される。細菌叢の変化については PCR-DGGE 法を、タンパク質分解に伴うアミノ酸の代謝の変化については qPCR 法を用いて解析し、併せて報告する予定である。

wastewater, DGGE, qPCR

講演番号：3C15p08
講演日時：3 月 19 日 15:55～ C 校舎 15 会場

# 循環型汚水浄化槽における微生物叢変遷とタンパク質分解に関わる代謝系についての解析

# Analyses on the transition of microbial flora and the metabolic system related to protein degradation in lab-scale wastewater treatment system

○増子 幸佑、鈴木 智順（東理大）
○KOSUKE MASUKO, TOMONORI SUZUKI (Department of Applied Biological Science, Tokyo University of Science)

【目的】 水処理技術における微生物を用いた生物学的処理は経済的、環境的な面で優れており、全国の浄化槽で広く用いられている。しかし、汚水浄化における微生物叢の実態についてはほとんど明らかにされていないため、浄化槽内の微生物叢のコントロールを行うのに、経験則に則った知識が用いられているのが現状である。そこで本研究は、循環型汚水浄化槽を構築し、微生物叢の変遷とタンパク質分解過程との関連性を明らかにすることを目的とした。
【方法】 循環型汚水浄化槽とは好気槽と嫌気槽からなる装置で、週に一度、生活排水を模した人工汚水と浄化槽汚水の交換を行っている。2016 年の 5 月と 7 月に本浄化槽からの経時的なサンプリングを行った。微生物叢の解析には 16S, 18S を用いた rDNA PCR-DGGE 解析を用いた。有機物分解能をみるために、TOC を測定した。タンパク質分解過程を解析するためにタンパク質定量、アンモニア態窒素測定、プロテアーゼ測定を行った。プロテアーゼ測定には、MCA 基質を用いた。MCA 基質とは、プロテアーゼにより加水分解されると、AMC という蛍光物質を遊離する。この AMC の蛍光強度から、酵素活性を算出した。今回使用した MCA 基質はアミノペプチダーゼ型 6 種、トリプシン型 6 種、キモトリプシン型 3 種の合計 15 種である。タンパク質量、アンモニア態窒素は 7 月のみ測定した。
【結果】 5 月と 7 月の浄化槽全体の酵素活性(好気槽､嫌気槽に含まれる細胞内外の酵素活性の合算)を算出し比較したところ、開始 6 h で酵素活性が上昇するが、12 h で酵素活性が下がり、18 h で再び上昇した。また、好気槽、嫌気槽の酵素活性を比較すると、ほとんどの時間帯で好気槽の方が嫌気槽よりも酵素活性が高かったにもかかわらず、36 h 以降はどちらの槽も同様な挙動を示す傾向にあった。TOC の値はどちらの槽も時間の経過とともに減少する傾向にあり、120 h 以降は一定の値を取っていた。また、タンパク質量はどちらの槽も 18 h までに減少したあと、120 h までは一定の値を取っていたが、144 h から上昇し始めた。アンモニア態窒素については、18 h まで上昇し、それ以降は減少する傾向にあった。また、好気槽と嫌気槽において、TOC、タンパク質量、アンモニア態窒素量には大きな差は見られなかった。
今回の実験結果から、タンパク質を構成するアミノ酸のアミノ基が遊離されたことにより、アンモニア態窒素が増加したと考える。しかし、その過程で酵素活性とタンパク質量、アンモニア態窒素量の挙動に関連性は見られないため、今回の実験で測定しなかった別の酵素がタンパク質分解に寄与していると考えられ、微生物叢の rDNA-PCR-DGGE 解析を行った結果も併せて報告する予定である。

wastewater treatment, microbial flora, protease

講演番号：3C15p09
講演日時：3 月 19 日 16:10～ C 校舎 15 会場

# 循環型汚水浄化槽から選別した細菌株が有機物分解に与える影響

Effect of the ability for organic matter decomposition by selected bacteria from the lab-scale wastewater treatment system

○田中 裕介、榊原 健太、鈴木 智順（東理大 応生）
○Yusuke TANAKA, Kenta SAKAKIBARA, Tomonori SUZUKI (Department of Applied Biological Science, Tokyo University of Science)

【目的】 浄化槽や汚水処理場などで、個々の微生物が生物学的処理に及ぼす影響についてはほとんど解明されていない。そこで本研究では、細菌・真菌・原生生物など様々な生物が定着しており、種々の有機物分解を行っている循環型汚水浄化槽の個々の細菌株の役割に着目した。そして、循環型汚水浄化槽から単離した細菌株を用い、統計学的に実験計画を組んで単離株を組み合わせることによって、個々の細菌が生物学的処理の有機物分解に与える影響を解明することを目的とした。 前大会では、循環型汚水浄化槽から分離した細菌 41 株を基に、$L_{128}(2^{127})$直交配列表を用いた部分実施実験を行い、41 株中 9 株が有機物分解に正や負の影響を与える可能性が示唆されたことを報告した。さらに、それら影響株 9 株のうち、正の影響を与えると示唆された株 4 株、負の影響を与えると示唆された株 5 株に分け、循環型汚水浄化槽からの分離株を用いて構築したミクロ生態系で有機物分解能を解析することで、影響の大きさを評価した。その結果、負の影響を与えていると示唆された株が、実際に負の影響を与えていることも報告した。そこで今回は、影響株 9 株が、循環型汚水浄化槽から分離した細菌株で構築したミクロ生態系のみでなく、循環型汚水浄化槽の好気槽から採取した汚水中の全微生物からなるミクロ生態系における有機物分解にどのような影響を与えるかを評価した。

【方法】 $L_{128}(2^{127})$直交配列表を用いた部分実施実験から有機物分解に影響を与えると示唆された 9 株のうち、正の影響を与えると示唆された株を好影響株、負の影響を与えると示唆された株を悪影響株とした。新たに作製した人工汚水培地に、循環型汚水浄化槽の好気槽から採取した汚水と、菌体量を変化させて、好影響株、悪影響株を L 字管に植菌した。経時的にサンプリングし、TOC の減少率を測定することで、好影響株と悪影響株が有機物分解に与える影響について評価した。

【結果】 循環型汚水浄化槽の好気槽から採取した汚水に、好影響株は正の影響を、悪影響株は負の影響を与えていることが示唆された。また、植菌時に影響株の菌体量を増やすに従って、その影響の大きさも増大した。今後は実験回数を重ねて再現性を確認するとともに、その影響の要因についても検証していく予定である。さらに、通常のミクロ生態系では様々な微生物どうしの相互作用が存在すると考えられるため、循環型汚水浄化槽から分離してきた純粋培養可能な細菌株が有機物分解に与える影響の評価のみならず、他の微生物との相互作用が必須で、通常の培地では単独で生育しない難培養微生物が有機物分解に与える影響についての考察も併せて報告する予定である。

lab-scale wastewater treatment system, organic matter decomposition, TOC

講演番号：3C15p10
講演日時：3 月 19 日 16:25～ C 校舎 15 会場

# 汚水浄化システムの細菌叢及び内部で活動する細菌の物質的依存関係の解析

# Analysis of bacterial flora and bacteria which require metabolites of others in Lab-scale wastewater treatment system

○島田 紘帆、鈴木 智順（東理大　応生）
○ Hiroho Shimada, Tomonori Suzuki (Department of Applied Biological Science, Tokyo University of Science)

【目的】 微生物は有機物の最終分解者として自然界の物質循環を支えている。それを生活排水の浄化に利用したシステムが浄化槽であり、当研究室ではそれを模した循環型汚水浄化槽を用い、内部で活動する微生物群集の解析を行ってきた。メタゲノム解析により、浄化槽内で生育する微生物には、現在単離されていない細菌が含まれることが明らかになっている。このような未培養細菌の増殖には、他の微生物の存在が重要であると考えられ、微生物による浄化システムを複雑化している。
そこで本研究では、特定の細菌(ヘルパー株)の代謝産物の存在下で増殖する細菌(代謝産物要求株)を単離し、その系統関係の解析を行い、浄化槽内で結ばれている物質的な依存関係の一端を明らかにすることを目的とした。
【方法】 代謝産物要求株の単離には処理水培地を用いた。培地に用いた処理水は人工汚水を循環型汚水浄化槽に投入後 1 週間経過した浄化槽内循環処理水を濾過滅菌することで調製した。処理水培地上にコロニーを生じた株のうち、人工汚水培地において増殖が確認されなかった株を代謝産物要求株とした。また、人工汚水培地で増殖が確認されたものをヘルパー株の候補として選択した。これらの株は 16S rDNA の塩基配列に基づいて同定を行った。ヘルパー候補株を各々人工汚水に植菌し、培養濾液を調製した。この培養濾液培地に代謝産物要求株を植菌し、増殖が確認された培養濾液を生産したヘルパー候補株をヘルパー株として選択した。また、菌叢解析のために浄化槽内部の微生物から DNA を抽出し、PCR による増幅産物を第 3 世代 DNA シーケンサ MinION により解析した。
【結果】 現在までに *Pseudomonas* 属 5 株(3Cr, 5Br, 5Dr, 5Er, 6Br)、*Alcanivorax* 属 1 株(5Fr)を代謝産物要求株として単離した。そのうち 3Cr 株は 16S rDNA の塩基配列から新種である可能性が示唆された。そして 3Cr 株のヘルパー株として *Pseudomonas* 属 3 株(9Ch, 9Eh, 10Dh)、*Brevibacterium* 属 1 株(JS5h)、*Proteus* 属 1 株(JS9h)を取得した。中でも JS5h 株は系統的な乖離にも関わらず 3Cr 株と 5Fr 株に対するヘルパー活性を同時に持つ事が明らかとなった。更に菌叢解析の結果から、3Cr 及び 9Ch, 9Eh, 10Dh の近縁種は浄化槽内で多数存在している事が示唆された。また、ヘルパー株の培養濾液と人工汚水の混合物では、培養濾液の比率を下げると一定比率までは 3Cr 株の増殖が向上し、一定以下になると増殖が見られなくなった。この事から、3Cr 株が必要とする代謝産物には活性を持つための閾値が存在する事が明らかとなった。今後はこの培養濾液に含まれる増殖因子を分離し、特定する予定である。

Symbiosis of bacteria, metabolic products, wastewater

講演番号：3C15p11
講演日時：3 月 19 日 16:50～ C 校舎 15 会場

タイ由来のアルコール飲料用スターターにおける微生物叢の解析
Analysis of microbial community in Thai alcohol starters
○北川 哲也[1]、米田 英伸[1]、高橋 裕里香[1]、西田 洋巳[1]、H-Kittikun Aran[3]、Prasertsan Poonsuk[3]、浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大工・生工研セ、[2]JST,ERATO、[3]Prince of Songkla University)
○Tetsuya KITAGAWA[1], Hidenobu KOMEDA[1], Yurika TAKAHASI[1], Hiromi NISIDA[1], Aran H-Kittikun[3], Poonsuk Prasertsan[3], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]ERATO,JST, [3]Prince of Songkla Univ.)

【目的】東南アジアでは、蒸米などのデンプン原料からアルコール飲料を製造するための団子状のスターターが広く用いられている。これらのスターターには、糖化や発酵に関わる微生物が含まれており、アルコール生産のための微生物源として有用であると考えられる。我々は現在までに、タイ各地で収集したスターターより各種培地を用いて、細菌、酵母、糸状菌を単離し、グルコース、キシロース、アラビノースからのエタノール生産性を検討する[1)]とともに、アラビノース代謝活性を示す酵母 *Meyerozyma caribbica* よりペントース代謝酵素を精製し、その機能解析を行った[2)]。また 7 種類のスターターについて、PCR-DGGE 法(DGGE: Denaturing gradient gel electrophoresis 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動)により微生物叢の解析を行った結果、発酵に関わる数種類の微生物の存在を確認することができた。本研究では、タイより新たに収集したスターターを含めた全 27 種類について、次世代シーケンサーを用いて微生物叢を解析するとともに、一部のスターターを用いて蒸米からのエタノール発酵を行い、発酵中での微生物叢の変化を解析することを目的とした。

【方法と結果】タイで収集した 27 種類のスターターから直接 DNA を抽出し、細菌の 16S rRNA 遺伝子(V3V4 領域)、及び真菌(酵母や糸状菌)の 28S rRNA 遺伝子(D1/D2 領域)を PCR で増幅して、次世代シーケンサーによる塩基配列決定を行った。その結果、細菌に関しては、18 種のスターター中で乳酸菌（*Lactobacillus* 属、*Lactococcus* 属、*Pediococcus* 属、*Leuconostocaceae* 科）が 50%以上を占めることがわかった。スターターによって優占種は異なり、3 種類のスターターでは *Lactobacillus* 属が、5 種類では *Lactococcus* 属が、8 種類では *Pediococcus* 属が、7 種類では *Leuconostoc* 属が優占していた。また真菌に関しては、多くのスターターにおいて *Rhizopus* 属や *Mucor* 属を確認することができた。さらに、一部のスターターを用いて蒸米からの発酵を行い、エタノールの蓄積量及び微生物叢を経時的にモニタリングした結果もあわせて報告する。

1）三澤ら、日本農芸化学会 2016 年度大会
2）Wiphat Sukpipat ら、2015 年度日本農芸化学会中部・関西支部合同大会

Alcohol fermentation, Starter, Next generation sequence

講演番号：3C15p12
講演日時：3 月 19 日 17:05～ C 校舎 15 会場

# 水田土壌より分離した新規電流生産菌 TKM1 株の性状解析

# Characterization of a novel exoelectrogen, desgignated as starin TKM1 isolated from rice paddy soil

○伴野 佑介[1]、高見澤 一裕[2]、中村 浩平[2] ([1]岐阜大院応用生物、[2]岐阜大応用生物)
○Yusuke Banno[1], Kazuhiro Takamizawa[2], Kohei Nakamura[2] ([1]Graduate School of Applied Biological Sciences, Gifu Univ., [2]Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu Univ.)

【背景・目的】微生物燃料電池（MFC）は、電流生産微生物を触媒として未利用バイオマス資源等の有機物がもつ化学エネルギーを、直接電気エネルギーに変換できる装置である。*Geobacter* 属や *Shewanella* 属などの異化的鉄還元細菌（Dissimilatory Fe(III) Reducer, DFR）が電流生産微生物のモデル生物としてよく知られているが、電流生産微生物の多様性とその性状に関する知見は少ない。我々は水田土壌を植菌源に、セルロース粉末を基質に用いた MFC から、DFR である *Melioribacter roseus* を最近縁種とする、TKM1 株を分離した。DFR には電流生産能を有するものが多いことから、TKM1 株は新規の電流生産微生物である可能性が示唆された。そこで本研究では TKM1 株の電流生産能と微生物学的諸性状の解析を試みた。
【方法】無機塩培地にグルコース、酵母エキスおよびトリプトンを添加した培地で TKM1 株を培養した。Carbon Felt をアノードに、白金触媒を塗布した Carbon paper をカソードに用いた空気正極型 MFC に TKM1 株を植菌した。MFC を 30℃で加温し、TKM1 株の電流生産能を確認した。基質（電子受容体・電子供与体）利用能と至適温度の調査には、培養液の濁度またはタンパク質濃度を測定した。細胞形態を位相差顕微鏡および走査型電子顕微鏡によって観察した。ゲノム DNA を抽出・精製し、PacBio RSII によるゲノム DNA 解析と Prokka によるアノテーションを行った。
【結果・考察】MFC における電流生産能試験を行った結果、試験開始直後から電流生産が確認された。TKM1 株には酸素利用能は無く偏性嫌気性であった。20-50℃の範囲で 40℃が生育至適温度であり、doubling time は約 80 時間であった。20℃および 50℃では生育が確認できなかった。Fe(III)イオンの還元が確認されたが、その還元に伴う培養液中の菌体タンパク質濃度の増加は無かったため、TKM1 株は DFR ではない可能性が示された。細胞形態は長さ 2-20 μm、幅約 0.5 μm の桿菌であり、単独、もしくは数十細胞からなる集合体を形成した。また、幾つかの細胞の先端には直径 0.7-2.0 μm の球状の構造体が見られた。ゲノムアノテーション結果により、多数の植物細胞壁分解酵素群の存在が示唆され、さらにセロビオース利用能が確認された。我々の知る限り、セルロースを基質とする電流生産菌は *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* しか報告されておらず、この発見は電流生産菌の知見を深めると期待される。今後本菌株のセルロース存在下における MFC 内での電流生産能を確認する予定である。

microbial fuel cell, exoelectrogen, iron-reducing bacterium

発表責任者：伴野佑介（v8121033@edu.gifu-u.ac.jp）

講演番号：3C15p13
講演日時：3 月 19 日 17:20～ C 校舎 15 会場

*Sulfolobus metallicus* に関連した新規好熱好酸性アーキアの系統分類学的研究
A systematic study of novel thermoacidophilic archaea related to *Sulfolobus metallicus*.
○三浦 樹[1,3]、河井 悦子[2,3]、高品 知典[1,2]、伊藤 隆[3]、大熊 盛也[3] ([1]東洋大院, 生命科学、[2]東洋大, 生命科学、[3]理研 BRC)
○ Tatsuki MIURA[1,3], Etsuko KAWAI[2,3], Tomonori TAKASHINA[1,2], Takashi ITOH[3], Moriya OHKUMA[3] ([1]Grad. Sch. Toyo Univ., [2]Toyo Univ., [3]RIKEN BRC)

*Sulfolobales* 目アーキアは陸上酸性温泉に優先するアーキアとして知られており、日本各地の温泉からも分離されている。本目の基準属である *Sulfolobus* 属の既知種 6 種は好気性、低 G+C 含量などの表現性状を有するが、系統学的には多様化しており、系統を反映させた再分類が求められている。本属中において *S. metallicus* は黄鉄鉱などの硫化鉱物や鉄を酸化する特徴を有した独立栄養性アーキアであり、本種は基準種の *S. acidocaldarius* と異なる系統に属している。近年、我々は箱根大涌谷より *S. metallicus* と近縁のアーキアである IC-006 株と IC-007 株の分離に成功した。本講演ではこれら分離株の分類学的性状および *S. metallicus* を含めた分類学的帰属について報告する。

分離株 2 株の分類学的性状として、生育条件（温度、pH）、嫌気的生育能（$N_2$ または $H_2$-$CO_2$＝（4:1,v/v））、耐塩性（NaCl 濃度 0-5%）、硫黄要求性、還元型硫黄化合物の利用性、独立栄養性及び単一炭素源の利用性について検討した。さらに、化学分類学的及び系統学的性状として脂質骨格、DNA G+C 含量、16S rRNA 遺伝子塩基配列、DNA-DNA 相同性の決定を行った。

分離株 IC-006、IC-007 の形態は不整形球菌であり、至適生育条件は 65 ℃、pH3.5 の好熱好酸性を示した。両株共に好気性を示し、耐塩性は IC-006 株では 0.7%、IC-007 株では 1.5%までの NaCl 存在下で生育可能であった。生育に元素硫黄あるいは還元型硫黄化合物を要求し、生育に伴い硫酸を生成した。分離株 2 株は独立栄養、従属栄養による生育がともに可能であり、糖類や複合基質を利用することが可能であった。DNA G+C 含量は共に 41 mol%と比較的高い値を示し、IC-006 株は *Sulfolobales* 目特有の極性脂質 calditoglycerocaldarchaeol を主要脂質成分としていた。16S rRNA 遺伝子による系統解析の結果、分離株 2 株と *S. metallicus* は 98%の配列類似性を示し、他の *Sulfolobus* 属既知種とは異なる 1 つの系統に属することが明らかとなった。

以上の結果から、分離株 2 株は *S. metallicus* と系統学的に近縁であり、他の *Sulfolobus* 属とは異なる系統であることが示された。さらに、分離株 2 株と *S. metallicus* の表現性状は互いに類似しており、生育上限温度や G+C 含量、硫黄要求性などの性状は他の *Sulfolobus* 属既知種とは区別できるものであった。一方で、分離株 2 株と *S. metallicus* とでは DNA-DNA 相同性が低く、耐塩性や従属栄養性において異なる性状を示した。したがって、分離株 2 株及び *S. metallicus* を *Sulfolobales* 目の新属とし、分離株 2 株を新種として提唱する。今後は、*S. metallicus* の特徴である鉄の酸化能や重金属耐性について、分離株 2 株と *S. metallicus* 間での比較を行う予定である。

archaea, thermoacidophiles, systematics

講演番号：3C15p14
講演日時：3 月 19 日 17:35～ C 校舎 15 会場

# MALDI-TOF MS を用いた放線菌の識別

# Identification of actinomycetes by MALDI-TOF MS

○高橋 裕子[1]、波多野 和樹[1]、五十嵐 雅之[1]、澤 竜一[1]、梅沢 洋二[1]、加藤 千明[2] ([1]微化研、[2]JAMSTEC)
○ Yuko TAKAHASHI[1], Masaki HATANO[1], Masayuki IGARASHI[1], Ryuichi SAWA[1], Youji UMEZAWA[1], Chiaki KATO[2] ([1]BIKAKEN, [2]JAMSTEC)

【背景・目的】放線菌は医薬品など多くの有用な生理活性物質を生産することが知られている。未知の放線菌の探索は有用な新規化合物の発見に繋がるため、これら放線菌の迅速識別が重要な課題となっている。近年、急速に普及している MALDI-TOF MS を用いた微生物同定法は、簡便性、迅速性、ハイスループット、コストの点から優れているが、既知標準菌株のライブラリと照合して同定するため未知微生物の探索には適していない。そこで我々は、MALDI マススペクトルから得られる再現性のある蛋白質由来イオンの違いにより未知放線菌の迅速識別に適応可能かを検討している。

これまでに人類未踏の地と考えられる深海に着目し深海底泥より得られた *Micromonospora* 属放線菌において、 MALDI-TOF MS を用いた 上記手法により種レベルでの識別が可能であることを報告している [1)]。本発表では、この方法を用いた新菌種の識別および代謝物との相関について報告する。

【方法】*Micromonospora* 属基準株 34 株と分離株 16 株について 16S rRNA 系統解析と MALDI-TOF MS 測定を行った。得られたマススペクトルをもとに類似度を算出し、これと 16S rRNA 相同性のいずれにおいても低い値を示した分離株について、 DNA-DNA 分子交雑法により種の判定を行った。また、MALDI マススペクトルの類似度をもとにクラスター分析を行うとともに、16S rRNA 系統樹で近接する菌株について、培養物の LC/MS データを用いた主成分解析を行い、これらの結果を比較した。

【結果】MALDI マススペクトルの類似度による識別の結果は、16S rRNA 相同性および DNA-DNA 分子交雑法による結果を支持した。このことから MALDI マススペクトルを用いた *Micromonospora* 属放線菌において、既存種と新種の識別が可能であることを示した。

MALDI マススペクトルのクラスター分析、16S rRNA 系統解析および代謝物主成分解析を比較した結果、MALDI マススペクトルのクラスターと代謝物主成分解析のスコアプロットでは菌株間の位置関係に相関が見られた。一方で 16S rRNA 系統樹と MALDI マススペクトルのクラスターもしくは代謝物主成分解析のスコアプロットでは乖離している部分が散見された。このことは、MALDI マススペクトルにおいて代謝等に関与する蛋白質由来イオンが検出されることにより反映したものと考えられたが、詳細な解析は現在検討中である。

1）2016 年度農芸化学会（札幌）3B002

MALDI-TOF MS, Microbial identification, Actinomycetes

講演番号：3C15p15
講演日時：3 月 19 日 17:50～ C 校舎 15 会場

新しい系統に属する中温性クテドノバクテリアの分離と系統分類
Isolation and taxonomic study of novel mesophilic *Ktedonobacteria*

○矢部 修平[1]、酒井 康輝[1]、王 瓊渼[1]、鄭 宇[1]、浜田 盛之[2]、大塚 重人[3]、阿部 敬悦[1]、横田 明[1]
([1]東北大院・農、[2]NITE・NBRC、[3]東大院・農学生命)
○Shuhei YABE[1], Yasuteru SAKAI[1], Chiung-Mei WANG[1], Yu ZHENG[1], Moriyuki HAMADA[2], Shigeto OTSUKA[3], Keietsu ABE[1], Akira YOKOTA[1] ([1]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [2]NITE・NBRC, [3]Grad. Sch. Agric. Life Sci.)

【研究背景】放線菌は抗生物質などの二次代謝物生産菌として医薬産業の発展に大きく貢献してきたが、近年、従来法による創薬リード化合物の発見頻度は著しく低下しており、新しい探索源の開拓が求められている。最近になって、*Chloroflexi* 門に放線菌様の分岐菌糸と出芽胞子を形成するユニークな分類群「クテドノバクテリア綱」の存在が明かとなった。その分離株のゲノム中には 21 個もの二次代謝物生合成遺伝子群を有するものもあり、筆者らはこの分類群が放線菌に次ぐ新しい創薬微生物資源に成り得ると推察し、多様なクテドノバクテリアの探索を続けている。これまでに地熱地帯やコンポストなどの高温環境から好熱性クテドノバクテリア 46 株を単離し、1 目 2 科 2 属 4 種を創設した。本系統は現在 2 目 3 科 3 属 6 種のみから成る未だ知見の乏しい系統であるが、次世代シークエンサーを用いた微生物叢解析結果から放線菌と同様に土壌などの身近な環境中に多様に棲息している事が分かっており、未だ開拓の余地が大きい微生物資源である。本報ではインドネシア由来の未分類の中温性 *Ktedonobacterales* S-27 株のコロニー形状や培養生理学的性質を参考に、国内の土壌から新たに多様な中温性クテドノバクテリアの分離を試み、S-27 株も含め分子系統解析を行った。

【方法・結果及び考察】

ゲランガムを固化剤とした 1/10 濃度の R2A 培地に各種抗菌材を添加した培地を用い、群馬県の湯の丸高原から採取した土壌を直接接種し、30℃にて 1 ヵ月間培養した。S-27 株のコロニー形状を参考に Digital Microscope KH8700(HiRox)を用いてクテドノバクテリア様コロニーを選択し、筆者らが設計した本綱特異的プライマーを用いて判別し、単離を試みた。現時点で単離した 13 株の 16S rRNA 遺伝子を解読し、S-27 株を含めて分子系統解析を行ったところ、すべてクテドノバクテリア綱に属し、EzTaxon を用いた相同性検索の結果、最近縁種は *Ktedonobacter racemifer* SOSP1-21T であり、相同性は 89-90%であった。また分離株と S-27 株との相同性は 90-97%であった。系統樹解析の結果から、S-27 株を含む 14 株中には科レベルで新規の 2 つの分類群と、少なくとも 5 つの新しい種が含まれる事が推定された。現在、これらの株の系統分類学的試験を実施しており、その結果についても報告する。

Ktedonobacteria, Chloroflexi, Actinobacteria

発表責任者：矢部修平（shuhei.yabe.b2@tohoku.ac.jp）

講演番号：3C15p16
講演日時：3 月 19 日 18:05～ C 校舎 15 会場

PCR-RFLP 法を用いた乳酸菌種のジェノタイピング
16S rDNA genotyping using PCR-RFLP(restriction fragment length polymorphism) analysis among lactic acid bacteria.
○玉川 英幸、伊藤 良仁（（地独）岩手県工技セ）
○Hideyuki TAMAKAWA, Yoshihito ITO (Iwate industrial research institute)

【背景と目的】乳酸菌は発酵食品の製造において極めて重要な役割を果たしており、これまでにヨーグルトをはじめとして、醤油、清酒、漬物など様々な発酵食品から多様な菌種が単離されている。乳酸菌をはじめとした微生物を簡易的に同定する方法としては、DNA シークエンサーを用いて対象微生物の 16S リボソーム DNA(rDNA)等の塩基配列を解析する方法一般的であるが、DNA シークエンサーは機器自体が高額であることに加え、評価に時間がかかること、ランニングコストもまた高額であり、分離候補の微生物がある程度定まっている場合には最適な方法とは限らない。

Restriction-Fragment Length Polymorphism (RFLP)法は、制限酵素によって切断された DNA 断片の長さが生物種間で異なる(多型を示す)ことを利用して各生物種を区別する方法の一つである。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)の反応産物に対して適切な制限酵素処理を行い、得られた DNA 断片の多型を解析することで生物種の区別を行うことが可能である(PCR-RFLP)。そこで、本研究では、特に発酵食品由来の乳酸菌の識別を対象にした最適な PCR-RFLP 法を確立することを目的とした。
【方法と結果】乳酸菌 84 種を対象として、それぞれの 16S rDNA 配列を 4 塩基認識の制限酵素 8 種(*Acc*II、*Afa*I、*Hae*III、*Hha*I、*Mbo*I、*Msp*I、*Taq*I、*Xsp*I)でそれぞれ処理した際に生じるフラグメントパターン（以下、制限酵素パターン）をシミュレーション解析した。その結果、*Xsp*I を用いたときに制限酵素パターン数が 34 種と最も多く、*Mbo*I がそれに次いだ(27 種)。各制限酵素パターン数は乳酸菌 84 種の 16S rDNA 配列が有する平均の制限酵素サイトの数とは相関がなく、むしろ制限酵素サイト数の標準偏差(SD)と相関する傾向が認められた。8 種の制限酵素パターンを組み合わせて評価することで 84 種の乳酸菌から 71 のジェノタイプが得られた。使用する制限酵素を 2 種のみに限定した場合のジェタノタイプ数は、*Xsp*I と *Mbo*I を用いた場合が最も多く、84 種の乳酸菌から 53 のジェノタイプが得られた。また、そのうち 38 種は特定の乳酸菌特異的なジェノタイプであった。また、乳酸菌 20 種を用いて実際に PCR-RFLP 解析を行い、シミュレーション通りの分類が可能であることを確認した。使用した乳酸菌 84 種の 16S rDNA 配列を用いて系統樹を作製し、*Xsp*I と *Mbo*I を用いた PCR-RFLP で決定したジェノタイプと比較確認を行ったところ、84 種のうち 81 種の乳酸菌が系統分類学的に妥当なジェノタイプが付与されていた。これらの結果より、*Xsp*I と *Mbo*I を用いた乳酸菌のジェノタイピングは乳酸菌の識別や同定、そしておおよその分類において有効であることを明らかにした。

Lactic acid bacteria, Restriction fragment length polymorphism, Genotyping

発表責任者：玉川英幸（h-tamakawa@pref.iwate.jp）

講演番号：3C17a01
講演日時：3 月 19 日 09:20～ C 校舎 17 会場

乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* 環境単離株における細胞外多糖層の合成量変化に伴うコロニー形態の相変異機構の解析

Phase variation of colony morphology associated with capsular polysaccharide synthesis in *Lactobacillus plantarum* environmental isolates

○江橋 由夏[1]、河嶋 伊都子[1]、尾花 望[1]、久保田 浩美[2]、清川 達則[1]、八城 勢造[2]、永井 智[2]、野村 暢彦[1] ([1]筑波大院・生命環境、[2]花王・安全性科学研)

○ Yuka EHASHI[1], Itsuko KAWASHIMA[1], Nozomu OBANA[1], Hiromi KUBOTA[2], Tatsunori KIYOKAWA[1], Seizo YASHIRO[2], Satoshi NAGAI[2], Nobuhiko NOMURA[1] ([1]Univ. of Tsukuba, [2]Kao Corp.)

乳酸菌の一種である *Lactobacillus plantarum* は、食品加工やプロバイオティクスとして利用される一方、食品変敗を引き起こす危害菌として報告されており、耐性獲得機構の理解およびその制御法の開発が望まれている。さらに本菌はバイオフィルム形成により様々なストレスに対する耐性が上昇することが明らかとなっている。

先行研究において、実環境中から単離した *L. plantarum* 環境単離株の集団中では、莢膜（細胞表層の多糖層）の合成量が異なる 2 種類のコロニー形態（Compact colony: Cc、Mucoid colony: Mc）が存在し、両者は相変異することが新規に明らかとなった。また Cc と Mc をそれぞれ単離し形成させたバイオフィルムでは、その構造やストレスに対する特異性、基質への付着能が異なることが示された。つまり莢膜産生を制御することによって周囲の環境に適応していると予想される。そこで本研究では *L. plantarum* 環境単離株において、ストレス耐性に関わる莢膜合成の調節機構の解明とその生態的理解を目的とした。

先行研究におけるトランスクリプトーム解析の結果より、Cc に比べ Mc では莢膜の合成に関与する *cps2* オペロンの発現量が上昇していた。さらに *cps2* オペロン上流の一部領域の配列に逆位が認められ、逆位配列中にプロモーター領域が予測された。また継代培養を経て得られた Cc、Mc においても同領域に逆位が確認され、部位特異的な逆位に伴い相変異を繰り返していることが示された。

実環境中では乳酸菌集団内に Cc と Mc が混在している。そこで Cc と Mc を共培養し、浮遊状態とバイオフィルム状態において、それぞれの存在比を解析した。Cc と Mc の初期植菌量を変化させ検証した結果、初期植菌量の割合に関わらず、浮遊状態では Cc と Mc が集団中に同程度存在するのに対し、バイオフィルム状態では Mc に比べ Cc が多く存在することが明らかとなった。つまり生育状態によって集団内の Cc と Mc の存在比が変化することが示唆された。

以上の結果より、配列逆位を伴った相変異によって *L. plantarum* 集団中に常に Cc と Mc を保持することが可能になると考えられる。実環境中で Cc と Mc のヘテロな集団を形成することで、様々なストレス存在下における集団全滅のリスクを低減していると予想される。さらに生育状態に伴って集団中における Cc と Mc の存在比を変化させ、環境適応を図っていると推測される。

lactic acid bacterium, biofilm, capsular polysaccharide

発表責任者：野村暢彦（nomura.nobuhiko.ge@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3C17a02
講演日時：3 月 19 日 09:35～ C 校舎 17 会場

*Lactobacillus agilis* BKN88 における走化性の解析
Analysis on chemotactic ability of *Lactobacillus agilis* BKN88
○近藤 和穂[1]、横田 健治[2]、五十君 靜信[2]、梶川 揚申[2]([1]東農大院・農化、[2]東農大・生応化)
○Kazuho KONDO[1], Kenji YOKOTA[2], Shizunobu IGIMI[2], Akinobu KAJIKAWA[2] ([1]Dept. Agr. Chem., Tokyo Univ. Agr., [2]Dept. Appl. Biochem., Tokyo Univ. Agr.)

【背景】一般的に腸管内に生息する *Lactobacillus* 属細菌は非運動性であるとされるが、一部の *Lactobacillus* 属細菌はべん毛を持ち、運動性を示す。これらの有べん毛 *Lactobacillus* 属細菌は環境中での生存に運動性を活用していると思われるが、過去の研究例は少なくべん毛を持つことの意義は明らかになっていない。有べん毛細菌の生態には走化性が大きく関わり、腸管由来の運動性細菌では粘膜や細胞への浸潤などに寄与していることが知られている。そこで本研究では、ニワトリ消化管由来の *Lactobacillus agilis* BKN 88 を供試菌株として走化性に関与する物質の探索と対応する受容体の同定を目的とした。
【実験方法】MRS 培地中で対数期まで培養した供試菌を用いて動物腸管に存在すると考えられるコール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、タウロコール酸ナトリウム、乳酸、酢酸、酪酸、パンクレアチン、ラクトフェリン、α-ディフェンシン 5、N-アセチル-D-グルコサミン、L-フコース、N-アセチル-D-ガラクトサミン、N-アセチルノイラミン酸を供試物質として Capillary 法による走化性試験を行なった。また、対数期の菌体を 0.1mM EDTA・1mM グルコース添加の 10mM リン酸カリウム buffer(pH7.0)に懸濁し各試験物質を添加後、動画の撮影、軌道追跡ソフトによる動画解析を行ない、菌体追跡後の軌跡の直線性を指標とした走化性の確認を行なった。
【結果および考察】13 種の物質について Capillary 法による走化性試験を行った結果、乳酸・酢酸・酪酸、デオキシコール酸ナトリウムにおいて負の走化性が確認された。腸内細菌が生産する有機酸に対する走化性は他の腸内細菌の影響が少なく生息しやすい環境への移動に寄与している可能性が考えられる。また胆汁酸の構成要素であるデオキシコール酸ナトリウムに対する走化性は殺菌作用のある物質から逃れ、生存することに寄与している可能性が考えられる。N-アセチル-D-グルコサミン、N-アセチル-D-ガラクトサミンにおいては正の走化性が確認された。これらはムチンの構成糖であるため、*L. agilis* の腸管粘液層への定着に関与している可能性が考えられる。また、走化性関連物質を添加した *L. agilis* 菌体懸濁液で顕微鏡による動画撮影を行い、軌道追跡ソフトを用いて解析を行った。その結果、酢酸・酪酸・乳酸・デオキシコール酸ナトリウムでは方向転換頻度の上昇が、N-アセチル-D-グルコサミンでは直線的な軌跡が観察された。これは Capillary 法での走化性試験の結果を支持するものであった。現在受容体の同定に向けた受容体欠損株の作出を試みている。

*Lactobacillus*, motility, chemotaxis

講演番号：3C17a03
講演日時：3 月 19 日 09:50～ C 校舎 17 会場

*Methylobacterium* 属細菌におけるメタノール走化性センサーの同定
Identification of methanol-chemotaxis sensor in *Mehylbacterium* species
○伊賀 俊貴[1]、加藤 純一[2]、谷 明生[1] ([1]岡山大植物研、[2]広島大院先端物質科学)
○Toshiki IGA[1], Junichi KATO[2], Akio TANI[1] ([1]IPSR Okayama Univ., [2]Hiroshima Univ., Grad. Sch. Adv. Sci. Matt.)

【目的】植物は年間約 1 億トンものメタノールを大気中に放出しており、そのメタノールを利用できる *Methylobacterium* 属細菌は植物表面上の細菌の 10-20%を占めている優占種である。本属細菌は、代謝産物を植物に与えたり、他の病原性菌と競合することで病原菌から植物体を守るといった働きがあり、植物の生育を促進する。本属細菌は植物と共生する前の段階で、何らかの物質を感知することで植物の存在を探し当てていると考えられる。私たちはエゾスナゴケから分離した *M. aquaticum* 22A 株をモデルとして植物との相互作用を解析する中で、本菌がメタノールに対して走化性を示すことを見いだした。本研究では本属細菌におけるメタノールへの走化性を司る遺伝子の同定を目的とした。
【方法】細菌の運動は鞭毛の回転に依存する。鞭毛の回転方向は methyl-accepting chemotaxis protein (MCP) というセンサータンパク質から発せられるシグナルと複数の chemotaxis protein (Che protein) によって制御されており、MCP の数だけ多様な化合物を認識すると考えられている。22A 株のゲノム中には MCP と考えられる遺伝子が 51 個確認されている。これらの中からメタノール走化性センサーを絞り込むために、ゲノム情報の明らかな複数の本属異種細菌のメタノールへの走化性テストを行うことで候補遺伝子を絞った。また 22A 株の遺伝子は pK18mobSacB ベクターを用いた相同組み換えにより欠失させた。
【結果】22A 株はメタノールの他にリンゴ酸、グルタミン、グリセリン酸に走化性を示した。また糖には走化性を示さなかった。絞り込みにより幾つかの遺伝子がメタノールセンサーと考えられ、それらをそれぞれ欠失させた変異株を作成した。変異株のメタノールへの走化性アッセイによりそのうち一つが野生株に比べてメタノールに対する走化性が減少することを見いだした。しかし走化性は完全には失われず、他にもメタノールセンサーが存在することが示唆された。またこの変異株はアミノ酸等には野生株と同等の走化性を示した。

*Methylobacteriu*, methanol, Methyl-accepting chemotaxis protein

講演番号：3C17a04
講演日時：3 月 19 日 10:05～ C 校舎 17 会場

*Paenibacillus* sp. の固形培地 に応答した鞭毛遺伝子の発現誘導
Expression of flagellar gene on solid media in *Paenibacillus* sp.
○小林 和夫 (奈良先端大バイオ)
○Kazuo KOBAYASHI (Nara Inst. Tech. & Sci.)

植物根圏より単離した *Paenibacillus* sp.は、固形培地上で特異な運動を示す。1.5%寒天培地上に接種すると、*Paenibacillus* sp.は接種部位で多数の小コロニーを形成し、各コロニーは約 220 μm/min のスピードで培地上を動き回りながら増殖する。コロニー密度が増加してくると、各コロニーは渦を巻くように自転をはじめ、最終的に停止して丸いコロニーを形成する。この運動のため、*Paenibacillus* sp.は、培地の一点に接種した場合でも、プレート全面に多数のコロニーを形成する。これまでに、*Paenibacillus* sp.の運動は、鞭毛に依存し、その鞭毛遺伝子の構成は、枯草菌と非常によく似ていることを明らかにしている。本研究では、まず運動能に必要な遺伝子を同定するために、mini-*Tn*10 を用いた運動欠損変異株のスクリーニングを行った。単離された大多数の運動能欠損変異は、鞭毛遺伝子への挿入変異であったが、その他に二成分制御系 *degSU*、S-layer の糖鎖形成に関わる *wsfP*、メチル化酵素 *fliB*、機能未知の *PBN151_4312*、*PBN151_3232* が同定された。そこで、これらの遺伝子の遺伝子破壊株を作製し、運動能、鞭毛形成への影響を調べた。その結果、*degSU*、*wsfP*、*PBN151_4312* は、鞭毛を形成できず、完全に運動能を失っていること、その原因は、鞭毛遺伝子の発現低下であることが明らかになった。また、これらの遺伝子破壊株における鞭毛遺伝子のプロモーター活性を調べた結果、*degSU* は、鞭毛形成初期遺伝子の発現に必要な *fla*/*che* プロモーターの活性を低下させるのに対し、*wsfP*、*PBN151_4312* は後期遺伝子の発現に必要なシグマ D 依存のプロモーター活性を低下させることが明らかになった。*Paenibacillus* sp.の鞭毛遺伝子は、固形培地で強く発現することから、固形培地を認識して発現誘導を行うシステムが存在すると考えられる。そこで、*degSU*、*wsfP*、*PBN151_4312* のうち、どの遺伝子がその機能を担うのか調べた結果、*degSU* 過剰発現株では、液体培地、固形培地の両方で、鞭毛遺伝子を高発現することが明らかになった。しかし、センサーキナーゼ DegS は、細胞質タンパク質で、菌体外の情報を直接感知するとは考えにくい。我々は、培地粘度の増加や遺伝子破壊により鞭毛の回転を抑制した場合に、鞭毛遺伝子の発現誘導がおこることを見出した。これらのことから、DegSU は、鞭毛が固形培地に接触し回転抑制を受けたことを感知して活性化し、鞭毛遺伝子の発現を誘導すると考えられた。鞭毛の回転抑制による DegSU の活性化は枯草菌においても報告されている。我々の結果は、枯草菌においても同様の固形培地認識を介した鞭毛誘導機構が存在することを示唆している。

motility, surface sensing, gene regulation

発表責任者：小林　和夫（kazuok@bs.naist.jp）

講演番号：3C17a05
講演日時：3 月 19 日 10:20～ C 校舎 17 会場

# 枯草菌分子シャペロンによる変異緩衝作用の検証

Analysis of mutational buffering effect by molecular chaperone in *Bacillus subtilis*.

○北村 夏美、法花津 匠、大塚 まみ、武井 若紗、小菅 是子、吉川 博文（東京農大・院・バイオ専攻）
○ Natsumi KITAMURA, Takumi HOKKETSU, Mami OHTSUKA, Wakasa TAKEI, Naoko KOSUGE, Hirofumi YOSHIKAWA (Tokyo Univ. of Agriculture)

【背景・目的】

Lindquist らは分子シャペロン Hsp90 の変異体を用いた実験において、ショウジョウバエの形態異常が多発したことから、分子シャペロンが突然変異を緩衝する、すなわち変異が表現型として顕れるのを防ぐ「変異の蓄電池機能」を持つという報告を行った[1)]。この説は、その後大腸菌酵素の変異でも報告されたが[2)]、バクテリアの変異蓄積と表現型への影響に対して同様のことが言えるかどうか、グラム陽性菌のモデル生物である枯草菌を用い、*rpoB* 変異によるリファンピシン耐性を表現型の指標として分子シャペロン GroES/L による変異緩衝作用の検証を試みた。

【方法・結果】

当研究室において、薬剤耐性菌の出現頻度を指標とした変異頻度評価系を構築した。この系と、枯草菌の誤対合修復酵素である *mutS* の破壊により変異を高頻度に誘発する株を用いて、RpoB に作用点を持つリファンピシンに対する耐性菌の出現頻度を求めた。その結果、IPTG 誘導により枯草菌の GroES/L を過剰発現させたときに、リファンピシン耐性菌の出現頻度が減少した。さらに、変異と表現型の関係性について解析したところ、リファンピシン耐性変異を獲得していたにも関わらず、GroES/L の過剰発現下で表現型としてのリファンピシン耐性を示さないものがあった。従って、染色体上の変異と表現型の変化に不一致が生じたことから、耐性変異が潜在化されたと考えられ、枯草菌の分子シャペロン GroES/L による変異緩衝作用が示唆された。また、リファンピシン耐性は *rpoB* 配列にアミノ酸置換を伴う一塩基変異が起きることで獲得されているものが多く、何種類も存在する。その中からいくつかの耐性変異を選出し、GroES/L による緩衝作用の有無について調べた。その結果、リファンピシン耐性変異点によって GroES/L による緩衝作用の強度に差が見られることがわかった。この現象は、アミノ酸置換の位置や種類との関係性を示唆しており、立体構造とシャペロンの緩衝作用の関連について考察する。

(1) Rutherford SL, Lindquist S. *et al.,* Nature. 1998
(2) Tokuriki N, Tawfik DS. *et al.,* Nature. 2009

*Bacillus subtilis*, Molecular chaperone, mutational buffering

講演番号：3C17a06
講演日時：3 月 19 日 10:45～ C 校舎 17 会場

枯草菌 RNAP コア酵素の変異による耐熱化と高温適応に対するトレードオフ
Acquisition of thermotolerance by RNAP core mutation and evolutionary trade-offs during temperature adaptation in *Bacillus subtilis*.
○高松 美沙樹[1]、兼崎 友[2]、朝井 計[3]、吉川 博文[1,2] ([1]東京農大・院・バイオ専攻、[2]東京農大・ゲノム解析セ、[3]埼玉大・院・理工)
○Misaki TAKAMATSU[1], Yu KANESAKI[2], Kei ASAI[3], Hirofumi YOSHIKAWA[1,2] ([1]Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Tokyo Univ. of Agriculture, Genome Research Center, [3]Saitama Univ.)

【背景・目的】我々は枯草菌 SigA プロモーターに内在する転写開始点に依存した熱ショック応答機構を解析してきたが、その過程で SigA のみを発現させるようにした株（SigA only 株）が 49℃ LB 培地において定常期に急速に溶菌することを見出した。そこから溶菌が起きにくくなった抑圧変異株を取得したところ、共通して *rpoC* の C 末端側に変異が見られた。この変異が溶菌の抑圧に寄与していることを検証した後、野生型の 168 株に *rpoC* 変異を導入したところ、熱耐性の上昇や胞子形成の低下をもたらすことを昨年度の本大会で報告した。今大会では、上記株の解析をさらに進めると共に、異なる手法で枯草菌耐熱化株を取得したので、併せて報告する。近年大腸菌等の研究において、高温耐性の獲得は温度適応性が高温へシフトするフィットネスのトレードオフであるという考え方が一般的になっている [1)]。枯草菌の耐熱化においても同様の視点で捉えられるか、何種類かの高温耐性株において検証した。
【方法・結果】168 株に *rpoC* 変異を導入した株において、増殖限界近傍の温度で処理後の生菌数を測定したところ、野生株と比較して生存率が上昇していた。このことから、*rpoC* の変異により細胞の耐熱性が上がったと考えられる。常温においては若干増殖速度の低下が見られたことから、転写活性の抑制が耐熱化に繋がっているのではないかと考え、致死的でない低濃度のリファンピシンを添加し生育を遅延させたところ耐熱性が増加することが分かった。一方、胞子形成率に関しては *rpoC* 変異株では 37℃において減少傾向が見られ、さらに 49℃においては大きく減少した。以上のことから、*rpoC* の変異により転写活性が変化し、常温での温度適応性および胞子形成能を落として（トレードオフ）耐熱化していることが示唆された。

胞子形成能の低下に関する *rpoC* 変異のさらに詳細なメカニズムを解析するため、胞子形成期特異的な遺伝子発現をリポーターアッセイにより検証したところ、SigA 依存プロモーターへの影響はわずかであったが、SigH プロモーター活性には大きく影響した。また、SigH のタンパク質量を経時的に調べたところ、蓄積量が減少していた。したがって RNAP コアの変異によってシグマ因子との親和性が変化したのではないかと考えている。

一方、長期連続培養を行い、徐々に温度をシフトすることにより、168 株の生育限界を超えた高温耐性株を別途取得した。これらのゲノム解析とフィットネスについても報告する。

1) Rodriguez-Verdugo et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 111, 12121 (2014)

*Bacillus subtilis*, RNA polymerase, thermotolerance

講演番号：3C17a07
講演日時：3 月 19 日 11:00～ C 校舎 17 会場

# 耐熱性の減少を目的とした加圧処理による枯草菌芽胞の状態変化の解析

# Analysis on high-pressure induced of *Bacillus subtilis* spores for decrease in thermal torelance

○平澤 貴昭、中原 健太、小林 裕紀、中島 加奈子、木戸 みゆ紀、林 真由美、野村 一樹、井口 晃徳、重松 亨（新潟薬大・応生科）
○Takaaki HIRASAWA, Kenta NAKAHARA, Hiroki KOBAYASHI, Kanako NAKAJIMA, Miyuki KIDO, Mayumi HAYASHI, Kazuki NOMURA, Akinori IGUCHI, Toru SHIGEMATSU (Niigata University of Pharmacy and Applied Life Science)

【背景】我々は、枯草菌（*Bacillus subtilis*）を芽胞のモデルとして用い、加圧・加熱処理による芽胞の不活性化機構を研究してきた。通常、枯草菌芽胞は80℃の加熱処理では不活性化しないが、500 MPa（50℃）10 min で加圧処理すると、除圧後の80℃の加熱処理により不活性化が生じることを明らかにした[1)]。この現象は、加圧処理により芽胞の多層構造に何かしらの変化が生じ、熱伝導性が向上した可能性を示している。そこで本研究では、加圧処理が及ぼす芽胞の耐熱性減少機構の解明を目的に、1：加圧処理と加熱処理を組み合わせた芽胞の物質の透過性の解析。2：走査型電子顕微鏡による加圧処理後の芽胞の表面構造観察。3：加圧処理後の芽胞の細胞密度を測定し、加圧処理が及ぼす芽胞の状態変化を多角的に解析した。
【実験方法】*B. subtilis* NBRC13719$^{T}$(Marburg)株の芽胞懸濁液に500 MPa(25℃～50℃)0、10 minの加圧処理を施し、Percoll PLUSを用いた密度勾配遠心法を用いて芽胞の細胞密度の変化を解析した。除圧後に80℃加熱処理を0または20 min行い、各種処理が芽胞表層に及ぼす影響を、走査型電子顕微鏡(JEOL JCM-6000)を用いて解析した。また、損傷した細胞膜のみを透過するDNA縫込み型蛍光色素PI（Propidium Iodide）を用いて芽胞への物質透過性を評価した。
【結果と考察】500 MPa(25～50℃)で加圧処理を施した結果、芽胞の不活性化は認められなかった。またPI染色は陰性であり（全芽胞の90%が染色されず未処理と同等)、細胞透過性はないと判断した。一方細胞密度は、25℃での加圧処理において加圧未処理と同等であったが、40、50℃の加圧処理では低下した。電子顕微鏡で芽胞表面を観察したところ、25℃の加圧処理では圧力未処理と大きな変化は見受けられなかったが、40、50℃では表面に「しわ」が確認された。芽胞に加圧処理後に80℃加熱処理を行うことで各加圧処理を施した芽胞の耐熱性を評価した。25℃での加圧処理芽胞を加熱処理した場合、芽胞の不活性化は起こらずPI染色も陰性であった。しかし40、50℃での圧力処理後の加熱処理では3-log不活性化し、PI染色は陽性(芽胞のPI染色率50%)であった。
500 MPa(40、50℃)の加圧処理によって細胞密度の低下が生じたことから、加圧処理によって芽胞内へ水が侵入したと考えられる。電子顕微鏡で観察された「しわ」は加圧処理により侵入した水が電顕観察時の高真空状態により蒸発してできたものと考えられる。従って500 MPa(40、50℃)の加圧処理を芽胞に施すことにより、芽胞の多層構造に変化が生じ、PIは透過できないが水の出入りができる状態となったと考えられる。その結果、熱の伝導率が向上し芽胞の耐熱性が低下したものと示唆された。

1) 平澤貴昭ほか：日本農芸化学会2016年度大会(3F051) (2016)

*Bacillus subtilis* spores, high pressure, thermal treatment

発表責任者：重松　亨（shige@nupals.ac.jp）

講演番号：3C17a08
講演日時：3 月 19 日 11:15～ C 校舎 17 会場

*Paenibacillus* 属細菌のバイオフィルム形成は芽胞の性質に影響を与える
Biofilm formation affects spore characteristics in *Paenibacillus* spp.
○加藤 寛子[1]、横山 佳奈[2]、尾花 望[3]、久保田 浩美[2]、八城 勢造[2]、永井 智[2]、野村 暢彦[3]([1]筑波大生物資源、[2]花王安全性科学研、[3]筑波大生命環境)
○Hiroko KATO[1], Kana YOKOYAMA[2], Nozomu OBANA[3], Hiromi KUBOTA[2], Seizou YASHIRO[2], Satoshi NAGAI[2], Nobuhiko NOMURA[3] ([1]College of Agrobiological Resource Sciences, University of Tsukuba, [2]Safety Science Research Laboratories, Kao Corporation, [3]Faculty of Life and Environment Science, University of Tsukuba)

【背景・目的】細菌の中には、芽胞と呼ばれる休眠状態の細胞を形成するものが存在する。芽胞は栄養細胞に比べて熱や薬剤に対して高い耐性を有しているため、食品業界では芽胞が加工食品へ混入、残存する可能性があり、微生物汚染の要因として問題視されている。*Paenibacillus* 属細菌の芽胞は、芽胞殺菌剤として用いられる過酢酸に対しても耐性を持っており、その制御が求められている。当研究室の先行研究により、*Paenibacillus* 属細菌は微生物の集合体であるバイオフィルム形成能を有しており、さらにその内部にも芽胞を形成していることが明らかとなった。実環境においては多くの微生物が浮遊状態ではなく、バイオフィルムを形成して生育していることから、我々はバイオフィルム由来芽胞の特性を理解することが重要であると考えた。そこで、本研究では *Paenibacillus* 属細菌のバイオフィルム中に形成される芽胞と浮遊菌から形成される芽胞の特性を解析し、比較した。

【方法・結果】当研究室で保有している *P. polymyxa*, *P. chibensis*, *P. glucanolyticus* を静置および振盪培養し、それぞれのバイオフィルム由来芽胞、浮遊菌由来芽胞の形態を位相差顕微鏡により観察したところ、いずれの株においてもバイオフィルム由来芽胞の方が長径が長いことが明らかとなった。また、*P. polymyxa* の芽胞の断面を透過型電子顕微鏡により観察したところ、バイオフィルム由来芽胞の方が最外層である coat が厚いことが示された。coat は芽胞の耐性に関与することが知られているため、次に熱耐性及び過酢酸耐性を比較した。その結果、いずれもバイオフィルム由来芽胞の方が耐性が高いことが明らかとなった。さらに、両芽胞の発芽効率を観察したところ、バイオフィルム由来芽胞の方が発芽に要する時間が長いことが示された。また、*P. polymyxa* は食品製造装置に多く用いられる材質であるステンレス上にもバイオフィルムを形成し、その内部に芽胞を形成することが示された。以上より、食品製造装置に *Paenibacillus* 属細菌がバイオフィルムを形成し、その内部に形成された浮遊菌由来芽胞よりも耐性の高い芽胞が加工食品へ混入、残存する可能性が考えられた。また、バイオフィルム由来芽胞では coat 構造および高い休眠性が様々なストレスに対する耐性向上に寄与すると考えられる。

spore, biofilm, *Paenibacillus*

発表責任者：野村　暢彦（nomura.nobuhiko.ge@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3C17a09
講演日時：3 月 19 日 11:30～ C 校舎 17 会場

*Paenibacillus alvei* No. 14 株の有する光反応機構のプロテオーム解析
Proteome analysis of light-response mechanisms in *Paenibacillus alvei* No. 14
○末崎 和弥[1]、吉原 周佑[2]、村上 周一郎[2] ([1]明治大院農・農化、[2]明治大農・農化)
○Kazuya SUEZAKI[1], Shusuke YOSHIWARA[2], Shuichiro MURAKAMI[2] ([1]Graduate School of Agriculture, Meiji Univ., [2]School of Agriculture, Meiji Univ.)

【背景・目的】当研究室において、遮光条件下でのスクリーニング過程において土壌団粒内部から分離された *Paenibacillus alvei* No. 14 株では、光によって増殖が抑制されることが見出されている。しかし、*Paenibacillus* 属における光による増殖抑制や光感受機構に関する報告はこれまでになく、他の細菌においてはトランスクリプトーム解析を中心とした遺伝子発現に関する報告が多い。そこで本研究では、プロテオーム解析により光照射条件下および遮光条件下で発現するタンパク質を比較することで、No. 14 株の光に対する反応機構をタンパク質レベルで解明することを目的とした。

【方法】No. 14 株を 30℃で 1/10 肉汁培地を用いて指数増殖初期まで振とう培養し、得られた菌体を光照射条件および遮光条件に分けて、振とう培養を続けた。培養 4 時間、8 時間、13 時間でそれぞれ菌体を回収し、回収した菌体から調製したタンパク質を二次元電気泳動により分離した。各培養時間において、光照射条件下と遮光条件下で発現量に有意に差異が見られたタンパク質を MALDI-TOF-MS 分析により同定した。また、同定したタンパク質の二次元電気泳動におけるスポット強度を培養時間ごとに数値化し、これらのタンパク質の経時的な発現量の変化を調べた。

【結果・考察】光照射条件下において、いくつかの抗酸化酵素の発現量が増加した。抗酸化酵素は、光照射によって生成した活性酸素種を除去していると考えられ、特に、過酸化脂質の消去能を持つ lipid hydroperoxide peroxidase の発現量は、培養に伴い顕著に増加していることが確認された。また、脂肪酸の合成に関与する 3-ketoacyl-ACP reductase も、光照射条件下で増加したことから、光照射は特に細胞の外側を覆っている脂質膜部分に影響をおよぼしている可能性が示唆された。

興味深いことに、No. 14 株は光照射条件下において増殖が抑制されているにも関わらず、増殖に関与する cell division protein FtsZ や糖代謝に関与するいくつかの酵素、エネルギー獲得に関与する ATP synthase の発現量が、遮光条件下と比べて高いレベルで維持されていることが確認された。また、胞子形成に必須である septation protein SpoVG の発現が、光照射によって抑制されていることが確認された。以上のことから、光照射条件下において No. 14 株は増殖と胞子形成を抑制しつつも、エネルギー代謝を維持していることが示唆された。

*Paenibacillus alvei*, light response, proteome analysis

発表責任者：村上周一郎（smura@meiji.ac.jp）

講演番号：3C17a10
講演日時：3 月 19 日 11:45～ C 校舎 17 会場

細胞毒素 Parasporin-1 受容体の探索
Screening of parasporin-1 receptor
○片山 秀樹、日下 芳友、奥村 史朗、水城 英一 (福岡県　工技セ)
○Hideki Katayama, Yoshitomo Kusaka, Shirou Okumura, Eiichi Mizuki (Fukoka Industrial Technology Center)

*Bacillus thuringiensis* (Bt) は胞子形成期に結晶性タンパク質とよばれる単独、もしくは複数のタンパク質から構成されるタンパク質の塊を生産する。特定の Bt 株が生産する結晶性タンパク質は特定の昆虫に特異的な殺虫活性を示すことから、一部の Bt 株は殺虫剤として利用されている。我々は調べた限りにおいて昆虫に殺虫性を示さなかった結晶性タンパク質中にヒト由来培養細胞株に特異的に作用する細胞毒素を見いだし、Parasporin というタンパク質ファミリーを提唱した。現在、Parasporin ファミリーに属するタンパク質は 19 種類あり、一次構造の相同性から 6 つのグループ(parasporin-1～-6)に分類されている。Parasporin-1(PS1)は 81-kDa の前駆体タンパク質として生産され、プロテアーゼによる部分分解により活性型毒素に変換される。活性型の PS1 は 56-kDa と 15-kDa のタンパク質からなるヘテロダイマーであり、感受性細胞に細胞外 $Ca^{2+}$の流入による持続的な細胞内 $Ca^{2+}$濃度上昇を引き起こし、最終的にアポトーシスを誘導する。PS1 の細胞選択性は高いことから感受性細胞には特異的な受容体が存在すると考えられる。そこで、本研究では PS1 の細胞特異性を説明するため HeLa 細胞における光反応性化学架橋剤(SBED)を用いた PS1 受容体の同定を試みたので報告する。さらに、同定したタンパク質の抗体が PS1 類似の細胞毒性を示したことを併せて報告する。

SBED を修飾した PS1 を HeLa 細胞に作用させ、紫外線照射により架橋反応を誘導した。照射後、SBED 分子に含まれるビオチンを指標にウエスタンブロットを行い、SBED のビオチンが転移した 2 種類のタンパク質を確認した。SBED 非標識 PS1 の大過剰添加によりこれらのタンパク質へのビオチン転移が低下したことから、これらのタンパク質は PS1 が結合すると考えられた。SBED のビオチンが転移したタンパク質を同定したところ、2 種類のタンパク質のうち一つはベクリン 1(BECN1)であることがわかった。BECN1 が細胞表面に発現している報告はないが、抗 BECN1 抗体を用いたフローサイトメトリーにより細胞表面への BECN1 の局在を分析したところ、ピークのシフトが認められ BECN1 の細胞膜表面における局在が強く示唆された。また、抗 BECN1 抗体と PS1 が拮抗することによる PS1 毒性活性阻害を確認しようとしたが、抗 BECN1 抗体は単独で HeLa 細胞に対する細胞毒性を示した。これは抗 BECN1 抗体が PS 1 同様の効果により HeLa 細胞に対して毒性を示した可能性が考えられた。そこで、抗 BECN1 抗体処理した HeLa 細胞のアポトーシス関連因子の変化をウエスタンブロットにより確認したところ、抗 BECN1 抗体は PS1 と同様 Caspase-8 の活性化を誘導することがわかった。以上のことより BECN1 は PS 1 の有力な容体候補分子であると結論した。

receptor, bacterial toxin

発表責任者：片山秀樹（hkatayam@fitc.pref.fukuoka.jp）

講演番号：3C17p01
講演日時：3 月 19 日 14:00～ C 校舎 17 会場

ロドコッカス属細菌における凝集形態と NRPS の関係についての解析
Analysis of the relationship between aggregate morphology and NRPS in *Rhodococcus* sp. SD-74
○茂木 亮介[1]、長田 啓司[1]、稲葉 知大[2]、尾花 望[3]、豊福 雅典[3]、野村 暢彦[3]([1]筑波大院・生命環境、[2]産総研・環境管理、[3]筑波大・生命環境系)
○ Ryosuke MOGI[1], Keiji NAGATA[1], Tomohiro INABA[2], Nozomu OBANA[3], Masanori TOYOFUKU[3], Nobuhiko NOMURA[3] ([1]Graduate School of Life and Environmental Sciences, Univ. of Tsukuba, [2]Environmental Management Research Institute, AIST, [3]Faculty of Life and Environmental Sciences, Univ. of Tsukuba)

発酵や排水処理において、微生物の凝集による沈降は重要な固液分離プロセスのひとつである。しかし、微生物凝集における分子メカニズムには未解明の部分もあり、現在においても微生物の凝集形態をコントロールすることは容易ではない。微生物の凝集形態制御機構を明らかにすることは、我々にとって重要な課題である。

*Rhodococcus* sp. SD-74 は、当研究室により土壌から炭化水素資化細菌として単離された放線菌群の細菌である。SD-74 株は多機能な糖脂質を生産することが明らかになっており、産業面での有効活用が期待されている。加えて、SD-74 株は液体培地中で粒径が最大で数 mm にも及ぶ巨大で強固な凝集体を形成する。共焦点顕微鏡を用いた経時的な凝集形態の観察により、SD-74 株の凝集形態は、①微小な凝集体の形成、②微小な凝集体の集合による凝集体の発達、③凝集体の崩壊による細分化、というライフサイクルを有していることが明らかになった。そのため、SD-74 株は自律的に凝集形態を制御していることが考えられた。トランスポゾンミュータントライブラリを作製し凝集形態異常株をスクリーニングしたところ、Nonribosomal peptide synthetase (NRPS) の一種をコードする遺伝子が凝集体の崩壊に必須であることが示された。一般に、NRPS は Nonribosomal peptide (NRP) と総称されるペプチドを産生する酵素である。凝集体崩壊時の NRPS 遺伝子の転写量は、凝集体崩壊前に比べて増大していることも明らかになったため、本 NRPS が産生する NRP が凝集体の崩壊を誘導する可能性が考えられた。ロドコッカス属細菌において NRP と凝集形態の関連を示す報告はなく、本研究は生態学的に興味深い結果を示している。加えて、本研究の成果は多くの産業用途に利用されている放線菌の凝集形態制御にも知見を与えるものであり、本研究は微生物産業の発展に資する可能性を示している。

Rhodococcus, aggregation, NRPS

講演番号：3C17p02
講演日時：3 月 19 日 14:15～ C 校舎 17 会場

# 希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* のべん毛形成に必須なチオレドキシン AMIS75470 の機能部位および標的タンパク質の同定

# Identification of the functional amino acid residues and target proteins of a thioredoxin, AMIS75470, which is essential for flagellar formation in *Actinoplanes missouriensis*

○木村 知宏、手塚 武揚、大西 康夫（東大院・農生科）
○Tomohiro KIMURA, Takeaki TEZUKA, Yasuo OHNISHI (Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., Univ. of Tokyo)

【背景・目的】希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* は、貧栄養環境下において数百個の胞子を内包した胞子嚢を形成する。成熟した胞子嚢は、湿潤環境下で開裂し、遊走子を放出する。遊走子はべん毛を持っており、最高速度 400 μm/sec の高速で遊走する。胞子嚢形成期特異的に転写が増大する遺伝子として注目した *AMIS75470* の遺伝子破壊株を作製したところ、この株の遊走子はべん毛を持たなかった。また、染色体組込み型シャトルベクターpTYM19 を用いて相補株を作製したところ、相補株の遊走子はべん毛を持っていた。AMIS75470 は他の生物のもつチオレドキシン-1 と高い相同性を示し、チオレドキシンモチーフも保存されている。当初我々は、30 種類以上のタンパク質の秩序立った組み立てが要求されるべん毛形成の過程において、AMIS75470 が標的タンパク質を還元することでべん毛タンパク質のアセンブリーに寄与しているのではないかと考え、研究を開始した。
【結果・考察】野生株と *AMIS75470* 破壊株の間で、べん毛関連遺伝子の転写量およびべん毛繊維タンパク質 FliC の発現量には、有意な差がないことを既に報告した(日本放線菌学会 2014 年度大会、筑波)。そこで次に、AMIS75470 の持つチオレドキシンモチーフ(CXXC)のシステインをセリンに置換した変異タンパク質をコードする遺伝子を持つプラスミドを破壊株に導入することで、変異タンパク質生産株を作製した。この株は、予想に反してべん毛形成能を有しており、チオレドキシン活性はべん毛形成に必須ではないことが示された。一方、べん毛を持たない放線菌である *Streptomyces griseus* に存在するホモログ(SGR690、相同性 58%)を *AMIS75470* 破壊株へ導入したところ、べん毛形成能は回復しなかった。これらの結果から、べん毛形成能に寄与するアミノ酸残基は、AMIS75470 と SGR690 の配列が異なる部分に存在すると考え、AMIS75470 と SGR690 のキメラタンパク質生産株を 17 種類作製し、それらの株が形成する遊走子のべん毛の有無を観察した。その結果、E101～Q105 の 5 アミノ酸がべん毛形成能に重要な機能を担っていることが明らかになった。
　次に、AMIS75470 はタンパク質間相互作用によってべん毛形成過程に関与していると仮定し、AMIS75470 の標的タンパク質を同定することを試みた。べん毛構成タンパク質のうち 23 種類を対象としてバクテリアルツーハイブリッド法により AMIS75470 との相互作用の有無を調べた結果、他の細菌において FliC の翻訳量調節に関わり、FliC との結合も報告されている FliW と AMIS75470 の間に相互作用が検出された。現在、*A. missouriensis* における FliW の機能を、べん毛アセンブリーとの関連に注目して解析している。

thioredoxin, flagellar formation, zoospore

発表責任者：木村知宏（kimura-tomohiro864@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3C17p03
講演日時：3 月 19 日 14:30～ C 校舎 17 会場

# 希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の胞子嚢形成に関与する AMIS76070 と相互作用するタンパク質の探索

# Search for proteins which interact with AMIS76070 involved in the sporulation of *Actinoplanes missouriensis*

手塚 武揚[2]、○小山 達樹[1]、安久都 卓哉[2]、大西 康夫[2] ([1]東大農、[2]東大院・農生科)
Takeaki TEZUKA[2], ○Tatsuki KOYAMA[1], Takuya AKUTSU[2], Yasuo OHNISHI[2] ([1]Fac. of Agric., Univ. of Tokyo, [2]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., Univ. of Tokyo)

【背景】希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* は栄養増殖時には菌糸形態で生長するが、栄養飢餓状態になると基底菌糸から胞子嚢柄を伸長し、内部に多数の遊走子を含んだ球状の胞子嚢を形成して休眠する。胞子嚢は湿潤環境で開裂し、内部の遊走子を放出する。過去に我々の研究グループでは胞子嚢の形成過程に注目した RNA-seq 解析を行い、栄養増殖時と比較して胞子嚢形成開始時に転写産物量が大幅に増大する遺伝子を同定した。その中の 1 つである *AMIS76070* は、その遺伝子破壊株が形成する胞子嚢の形態に異常が見られ、かつ開裂条件下で放出される遊走子の数が激減していたことから、胞子嚢形成に関わることが示唆されている（安久都ら、日本農芸化学会 2016 年度大会、3F112）。*AMIS76070* は response regulator（RR）と呼ばれる遺伝子発現の制御因子をコードしているが、他の多くのものとは異なり effector domain と呼ばれる DNA 結合ドメインをもたない。RR は環境シグナルのセンサータンパク質である histidine kinase（HK）からのリン酸基転移によって活性化される。いくつかの細菌では effector domain を欠いた RR による制御系が知られているが、放線菌での研究は報告されていない。本研究では *A. missouriensis* の胞子嚢形成の制御機構を解明するため、AMIS76070 を介したシグナル伝達に関わるタンパク質の探索を行った。
【方法・結果】*A. missouriensis* ゲノム中の全遺伝子のうち、AMIS76070 にリン酸基を受け渡す可能性のある orphan かつ非 hybrid 型の HK をコードする遺伝子は 24 個存在する。大腸菌を用いた two-hybrid 法によってこれらの HK 遺伝子産物と AMIS76070 との相互作用の有無を解析したところ、AMIS1710 と AMIS76070 間の相互作用が検出された。また、*Streptomyces coelicolor* A3(2) において胞子形成に必須なタンパク質 SsgB のホモログをコードする *AMIS65300* が遺伝子破壊株を用いた解析によって *A. missouriensis* の胞子嚢形成に必須であることが判明している（安久都ら、日本農芸化学会 2015 年度大会、2B41p17）ことから、AMIS76070 と AMIS65300 の相互作用を同様に two-hybrid 法で解析した結果、両者の相互作用が検出された。以上の結果より、AMIS1710 から AMIS76070 へのリン酸基転移および AMIS76070 と AMIS65300 の相互作用によって *A. missouriensis* の胞子嚢形成が制御されていることが示唆された。現在、*AMIS1710* 遺伝子破壊株の作製とその表現型の解析、および AMIS1710、AMIS65300、AMIS76070 の組換えタンパク質を用いた pull-down assay による *in vitro* でのタンパク質間相互作用の有無の解析を行っている。

*Actinoplanes missouriensis*, sporulation, response regulator

発表責任者：小山達樹（tororrow28owl@gmail.com）

講演番号：3C17p04
講演日時：3 月 19 日 14:45～ C 校舎 17 会場

# 麹菌 *Aspergillus oryzae* の金属プロテアーゼ insulysin の機能解析

Analysis on physiological functions of insulysins in *Aspergillus oryzae*.

○鈴木 遥香、吉永 良平、竹内 道雄、山形 洋平 (農工大農)
○Haruka SUZUKI, Ryohei YOSHINAGA, Michio TAKEUCHI, Yohei YAMAGATA (Tokyo Univ. of Agriculture and Technology))

【背景・目的】

*Aspergillus oryzae* は EST 解析及び全ゲノム解析によりヒト insulysin の ortholog を 3 つ有していることが推定された。真核生物の優れたモデル生物である酵母では, *Saccharomyces cerevisiae* の Ste23, *Schizosaccharomyces pombe* の Iph1 が insulysin のオルソログとされている。いずれのプロテアーゼも推定アミノ酸配列においてヒト insulysin と約 40%という高い相同性を持つ。また，ヒト insulysin と同様に insulin や amyloid-β の分解能を有することも報告されている。その他，出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における ortholog, Ste23 は α-prohormone の成熟化に関与している事が報告されている。一方，分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* における ortholog, Iph1 をコードする *iph1* 遺伝子の欠損は野生株より高い ER ストレス耐性を誘導する事，Iph1 が TORC1 の産生を制御する事が報告されている。 *A. oryzae* の 3 つの ortholog 酵素もヒトや酵母の insulysin と高い相同性を持つことは推定されたが，機能についてこれまで報告はない。しかし，ヒトや酵母には 1 つしかない insulysin をコードする遺伝子を *A. oryzae* は 3 つ有していることから，３つの遺伝子は *A. oryzae* 固有の役割を持つ，または機能を分担・相補している可能性が示唆された。本研究ではこれらの酵素をコードする遺伝子 *insA*, *insB*, *insC* の各遺伝子欠損株を作製し，欠損株の表現型を比較する事で各酵素の生体内での機能を明らかにすることを目的としている。

【方法・結果】

作製した *ΔinsB* 株，*ΔinsC* 株と野生株について, ツニカマイシンを添加した Czapek-Dox 液体培地で培養を行ったところ, 寒天培地での場合と異なり *ΔinsC* 株は野生株，*ΔinsB* 株より生育が良くなる事が明らかとなった。一方，ER ストレス刺激の有無による *insA, insB, insC,* 及び UPR 関連遺伝子の転写量解析を行った結果，野生株では ER ストレス刺激によって *insA* の転写量が約 2 倍に増加した。これに対し，*ΔinsB, ΔinsC* 株では ER ストレス刺激による *insA* の転写量増加は見られなかった。このことから InsA が ER ストレス耐性に関与しており，ER ストレスによる *insA* の転写促進は InsB や InsC によって制御されている可能性が示唆された。

なお，本研究の一部は生研センター基礎推進事業の一環として行われたものである。

microorganism, insulysin, protease

講演番号：3C17p05
講演日時：3 月 19 日 15:00～ C 校舎 17 会場

# 酵母凝集反応を利用した新規エピジェネティック変異原検出法の開発

# Epigenetic mutagen can be detected by using the yeast flocculation as indicator

○杉山 圭一、古沢 博子、グルーズ ピーター、本間 正充（国立衛研・変異遺伝部）
○Kei-ichi SUGIYAMA, Hiroko FURUSAWA, Petr GRUZ, Masamitsu HONMA (Nat. Inst. Health Sci.)

【背景】近年、プロモーションなどの発がん機序にエピジェネティック制御のかく乱が指摘されるなか、エピジェネティック変異原（エピ変異原）検出系の早期の開発が求められているが、現時点では衆目の一致するところのエピ変異原短期スクリーニング系はない。一方、真核微生物の出芽酵母においては、DNA metyltransferase（*DNMT*）遺伝子は未同定であるが、既に我々はヒト *DNMT* 遺伝子形質転換酵母（ヒト *DNMT* 酵母）が凝集性を獲得し、凝集関連遺伝子の 1 つ *FLO1* 遺伝子の mRNA レベルが亢進していることを明らかにしている [1)]。さらに、この凝集性は DNMT 阻害剤とヒストン脱アセチル化酵素阻害剤（HDACi）に可逆的に応答することも報告している [1, 2)]。
【目的】本研究では、酵母凝集性を指標にエピ変異原の同定を試みた。被検物質として、元既存添加物であるアカネ色素含有成分のアリザリンを用いた。アントラセン誘導体のアリザリンはプロモーション作用が指摘され、同色素はげっ歯類を用いた発がん試験で発がん性が認められている。
【方法】凝集レベルは画像より半定量化し、*FLO1* 遺伝子の転写レベルは RT-PCR により解析した。Western blot によりヒストン H3 量を、また DAPI を用いた核染色像の観察によりクロマチン構造に対する影響を検討した。GFP を用いた *FLO1* レポーターアッセイ系を構築し、アリザリンが同活性に示す作用も検証した。なお、ヒト *DNMT* 酵母には、DNA 維持メチル化酵素 *DNMT1* と新規メチル化酵素 *DNMT3B* 遺伝子発現プラスミドを出芽酵母に形質転換した株を使用した。
【結果および考察】ヒト *DNMT* 酵母およびコントロール株において、アリザリン濃度（0 - 4.0 μM）依存的な凝集と、*FLO1* mRNA レベルの上昇が確認された。一方、アントラセン処理では同様の作用は認められなかった。HDACi のトリコスタチン A もアリザリンと同様の効果を示すことから、コアヒストンに対するアリザリンの作用を検討したところ、ヒストン H3 量の減少と DAPI による核染色像の異常が観察された。また、凝集誘発作用をより高感度に検出できるコントロール株において、アリザリンによる *FLO1* レポーター活性の上昇も確認された。以上の結果は、アリザリンがエピ変異原であること、また酵母凝集性を指標にエピ変異原が検出できることを示唆している。

1) Sugiyama, K., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **456,** 689-694 (2015).
2) Sugiyama, K., *et al.*, *Mutagenesis* **31,** 687-693 (2016).

yeast, flocculation, epigenetic mutagen

発表責任者：杉山圭一（sugiyama@nihs.go.jp）

講演番号：3C17p06
講演日時：3 月 19 日 15:25～ C 校舎 17 会場

新規 in vitro assay 系を用いた Gtr 非依存的 TORC1 活性化経路の解析
A newly developed in vitro TORC1 kinase assay recapitulates the Gtr-independent glutamine-responsive TORC1 activation mechanism
○谷川 美頼、前田 達哉（東大・分生研）
○Mirai TANIGAWA, Tatsuya MAEDA (Tokyo Univ.)

プロテインキナーゼ TOR を触媒サブユニットに持つ TOR 複合体 1（TORC1）は、細胞成長を制御する過程の中核を担っており、その構造、機能ともに真核生物に広く保存されている。TORC1 は、アミノ酸などの栄養や増殖因子によって活性化され、タンパク質合成などの同化作用を促進するとともにオートファジーなどの異化作用を抑制することで細胞成長を促す。この制御は厳密になされており、その破綻は糖尿病やがんなどの疾病の進行と深く関わっていることから、TORC1 の特異的阻害薬であるラパマイシンは免疫抑制剤や抗がん剤として臨床で使用されている。

アミノ酸による TORC1 の活性化機構は、独立した複数の経路を介してなされることが明らかになっている。そのうちの一つは、低分子量 G タンパク質 Rag（あるいは酵母オルソログ Gtr）のヘテロ 2 量体を介した経路で、Rag/Gtr 2 量体を制御する種々の分子が同定されており、その多くは哺乳類・酵母間で保存されている。一方、Rag/Gtr 2 量体を介さない経路については、グルタミンによって活性化されることが示唆されているがほとんど研究が進んでいない。

我々は、酵母の精製した液胞膜を用いることにより、アミノ酸依存的な TORC1 の活性化を *in vitro* で検出することに初めて成功した。この *in vitro* のアッセイでは、TORC1 はグルタミン特異的に活性化され、その活性化に Gtr 複合体は不要であった。このことは、我々が構築した *in vitro* の系が Gtr 非依存的な経路のみをモニターしており、その活性化は *in vivo* の結果から予想されていた通りグルタミン特異的であることを示している。そこで次に、この *in vitro* の系を使って Gtr 非依存的な経路の構成因子の同定を試みた。その結果、PI3 キナーゼ Vps34、および PI(3)P の結合モチーフである FYVE ドメインをもつ Pib2 がグルタミン応答に必要であった。さらに Pib2 はグルタミン刺激依存的に TORC1 と結合することを明らかにした。これらの結果は、Vps34 により産生された PI(3)P を介して液胞膜上にリクルートされた Pib2 が、グルタミン依存的に TORC1 と結合することで TORC1 の活性化に寄与していることを示唆している。

TORC1, rapamycin, amino acids

講演番号：3C17p07
講演日時：3 月 19 日 15:40～ C 校舎 17 会場

# 菌類遺伝子プロモーターにおけるヌクレオソーム位置のエピジェネティクス
# Epigenetics of Nucleosome Position on Fungal Gene Promoters

○中宮 ひかる、居島 冴香、西田 洋巳（富山県大）
○Hikaru NAKAMIYA, Saeka IJIMA, Hiromi NISHIDA (Toyama Pref. Univ.)

【背景・目的】真核生物のゲノム DNA はヒストン 8 量体に巻き付きヌクレオソームを形成する。ヌクレオソームの構造や位置はヒストン修飾によって変化することがあり、遺伝子発現のエピジェネティックな制御において重要な役割を果たす。古生子嚢菌酵母 *Saitoella complicate* はヒストン脱アセチル化酵素抑制剤であるトリコスタチン A（TSA）によって異常な細胞形態をとり、154 遺伝子で発現レベルが TSA 濃度依存的に増加、131 遺伝子で減少した（Yamauchi et al., 2016）。また、これら 285 遺伝子について TSA 非存在下と TSA 存在下（3 μg/mL）で翻訳開始点から 500 nt 上流と下流のヌクレオソーム位置プロファイルを比較すると、翻訳開始点から 300 nt 上流のプロモーターで異なる領域が見られた。本研究では、ヌクレオソーム DNA 断片に対して定量 PCR を行い、ヌクレオソーム位置が TSA 濃度依存的に変化するプロモーターの有無を明らかにする。
【方法】*S. complicata* を YM 培養液で 25 ℃、24h 培養し、TSA（1, 2, 3 μg/mL）処理を 24h 行った。集菌し細胞壁処理を行いミクロコッカルヌクレアーゼ（1U）でリンカーDNA を消化した。フェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿後、2%アガロースゲル電気泳動によってヌクレオソーム DNA 断片を分離した。モノヌクレオソーム DNA のバンドを切り出し、ゲルから抽出した。TSA 濃度依存的に発現が促進/抑制され 4 つの遺伝子プロモーターの、TSA の有無でヌクレオソーム位置プロファイルが異なる 6 つの領域をターゲットにプライマーを設計した。このプライマーを用い、各 TSA 濃度のモノヌクレオソーム DNA 断片に対して定量 PCR を行い、ヌクレオソーム形成レベルを比較した。
【結果】6 つの異なる領域におけるヌクレオソーム形成の頻度比較より、1 つの領域以外では、分散分析において、有意差が見られた。また、ペアワイズ *t* 検定の結果、TSA 0 μg/mL と 1 μg/mL では 5 つの領域すべてにおいて有意差があったが、TSA 1 μg/mL と 2 μg/mL においては、3 領域、TSA 2 μg/mL と 3 μg/mL では 5 つすべての領域において有意差がなかった。この結果は、遺伝子プロモーターにおけるヌクレオソーム位置に変化が生じた領域では、多くの場合、TSA 1 μg/mL のときに生じ、2 μg/mL、3 μg/mL ではそれから変化していないことを示している。
【文献】Yamauchi et al. (2016) Genome-wide maps of nucleosomes of the trichostatin A treated and untreated archiascomycetous yeast *Saitoella complicata*, AIMS Microbiol. 2, 69-91

nucleosome position, *Saitoella complicata*, fungal gene promoter

講演番号：3C17p08
講演日時：3 月 19 日 15:55～ C 校舎 17 会場

出芽酵母の栄養応答に関わる新規細胞表層タンパク質の同定
Identification of cell surface protein responsible for nutrient signaling in budding yeast
○梅川 碧里、氏原 将人、中井 大貴、若山 守（立命生命）
○Midori UMEKAWA, Masato UJIHARA, Daiki NAKAI, Mamoru WAKAYAMA (Ritsumeikan Univ.)

**【背景・目的】**細胞は環境中の栄養レベルに応じ、細胞増殖、代謝などのさまざまな生体反応を厳密に制御している。細胞内外の栄養シグナルを統合し、多くの生体反応の調節を司る分子としては、酵母からヒトに至る広範な真核生物に保存されたキナーゼ複合体である The target of rapamycin complex1(TORC1)が知られている。TORC1 は富栄養条件下では活性化され、アミノ酸などの栄養源が枯渇すると不活化されることが判っているが、種々の栄養シグナルがどのようにして TORC1 に伝達され、そして TORC1 自体の活性がどのようにして制御調節されているのか、その分子メカニズムは明らかでない。本研究では、出芽酵母を用いて、TORC1 の上流に位置する新たな分子を同定し、TORC1 の活性制御機構を明らかにすることを目的とした。
**【方法】**先行研究において我々は、出芽酵母のαマンノシド糖鎖分解酵素である Ams1 の細胞内活性が、TORC1 により負の制御を受けており、富栄養条件下では抑制され、飢餓条件下では強く誘導されることを見出している[1]。そこで、Ams1 の細胞内活性の変動を指標に、出芽酵母の種々の遺伝子欠損株を網羅的に解析した。
**【結果と考察】**細胞表層に局在する機能未知の GPI アンカー型タンパク質である ECM33 の欠損株においては、栄養条件下における Ams1 の細胞内活性が著しく向上しており、ECM33 が富栄養条件下における TORC1 の上方制御に関与することを見出した。*ECM33* 欠損株では栄養条件下での細胞増殖速度が低下することが報告されているものの、細胞内での機能は不明である。*ECM33* 欠損株では、富栄養条件下において TORC1 により直接的にリン酸化される ATG13 のリン酸化レベルが低下していた。さらに、富栄養条件下では TORC1 により抑制されるオートファジーの誘導レベルが有意に亢進していた。これらの結果から、細胞表層に局在する ECM33 が細胞質に局在する TORC1 の上流で細胞外の栄養シグナルを感知し、富栄養条件下における TORC1 のキナーゼ活性の上方制御に関与する可能性が考えられる。
**【参考文献】**[1]“The signaling pathways underlying starvation-induced upregulation of α-mannosidase Ams1 in *Saccharomyces cerevisiae*” *Biochim Biophys Acta.* **1860**(6):1192-1201(2016)

Nutrient signaling, Budding yeast, TORC1

発表責任者：梅川　碧里（midoriumeko@hotmail.com）

講演番号：3C17p09
講演日時：3 月 19 日 16:10～ C 校舎 17 会場

出芽酵母のストレス応答に関わる 4 つの新規陽イオンチャネルの機能解析
Mutational analysis of the four novel cation channels involved in response to various stresses in *Saccharomyces cerevisiae*
○上原 千央、星 直美、浜本 晋、魚住 信之（東北大・院工・バイオ工学）
○Chihiro UEHARA, Naomi HOSHI, Shin HAMAMOTO, Nobuyuki UOZUMI (Grad. Sch. Eng, Tohoku Univ.)

【目的】$Ca^{2+}$によるシグナル伝達によって細胞は様々な環境ストレスへの適応や生体内の恒常性の維持を行っている。高浸透圧に応答して $Ca^{2+}$を透過する植物の輸送体 OSCA1 遺伝子は多くの生物に存在が確認されている。出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）に 4 つの *OSCA1* ホモログ遺伝子が存在し、そのうち *spo75* と *rsn1* が細胞壁合成、*spo75* がアルカリ pH 耐性の獲得に関与していることを昨年度の本学会で報告した（農芸化学会 2016 年度大会）。今回、単一遺伝子欠損株を用いた酵母 OSCA1 ホモログの生理的役割の解析結果を報告する。【方法と結果】出芽酵母はアルカリ pH の環境下で活性酸素種が蓄積し、酸化ストレスを受けることが報告されている。*spo75* 欠損株がアルカリ pH で感受性を示したため、各 OSCA1 ホモログの酸化ストレスへの関与を検討した。酸化ストレスを誘導する過酸化水素を含む培地で各 *OSCA1* ホモログ遺伝子欠損株と野生株の生育を比較した結果、*spo75* 欠損株と *rsn1* 欠損株の生育が野生株よりも阻害された。加えて、酸化ストレスを誘導するエタノールを含む培地でも同様の実験を行った結果、*spo75* 欠損株の生育が野生株よりも阻害された。これらのことから、Spo75 と Rsn1 は酸化ストレスに対する応答に関与することが示唆された。さらに、酸化ストレスを誘導する熱ショックに晒し、各 *OSCA1* ホモログ遺伝子欠損株と野生株の生存率を比較した。その結果、*spo75* 欠損株と *rsn1* 欠損株の生存率が野生株にと比較して大きく低下した。以上からも Spo75 と Rsn1 が酸化ストレスへの応答に関与していることが予想された。また、細胞壁の構築を制御する Cell Wall Integrity 経路に $Ca^{2+}$シグナル伝達が関わっていることが報告されている。キチンの合成を阻害する Calcofluor White と、多糖に結合してキチン、1,3-β グルカン、1,6-β グルカンの合成を阻害する Congo Red に対して *spo75* 欠損株と *rsn1* 欠損株がそれぞれ感受性を示したため、$Ca^{2+}$の添加によってこれらの細胞壁合成阻害剤に対して生育が相補されるか検討した。細胞壁合成阻害剤含有培地に $Ca^{2+}$を添加して生育試験を行った結果、*spo75* 欠損株と *rsn1* 欠損株の生育が回復した。さらに、OSCA1 ホモログのイオン輸送活性を検討するために大腸菌 $K^+$輸送体変異株に各 *OSCA1* ホモログ遺伝子を導入し、低 $K^+$濃度培地での生育相補試験を行った。その結果、*phm7* 導入株の生育が相補された。したがって Phm7 が細胞内へ $K^+$を輸送する機能をもつこと示された。以上の結果より、Spo75 と Rsn1 が酸化ストレス応答に関与していること、それらの欠損による細胞壁合成阻害剤への感受性は $Ca^{2+}$の添加によって回復することが明らかとなった。OSCA1 ホモログがイオンホメオスタシスを制御することで様々なストレス応答に関与することが示された。

Saccharomyces cerevisiae, cation channel, stress response

講演番号：3C17p10
講演日時：3 月 19 日 16:25～ C 校舎 17 会場

酵母膜ドメイン・エイソソームの構造・機能に関わる遺伝子群の解析
Analysis of gene cluster that relates to eisosome, the plasma membrane domain, in *Shaccaromyces cerevisiae*.
○橋井 圭介[1]、田原 悠平[2]、宮田 真人[2]、八重 佳織[1]、田中 直孝[1]、田淵 光昭[1] ([1]香川大農、[2]大阪市大)
○Keisuke HASHII[1], Yuhei TAHARA[2], Makoto MIYATA[2], Kaori YAE[1], Naotaka TANAKA[1], Mitsuaki TABUCHI[1] ([1]Kagawa Univ., [2]Osaka City Univ.)

出芽酵母は 3 つの互いに重なり合うことのない膜ドメインを有しており、それぞれに存在するタンパク質によって MCC (Membrane Compartment occupied by Can1), MCT (Membrane Compartment occupied by TORC2), MCP (Membrane Compartment occupied by Pma1)と呼ばれている。その中でも、MCC にはエイソソームと呼ばれる細胞膜が内側に貫入した裏打ち構造が存在する。近年の報告によると、分裂酵母のエイソソームは低浸透圧時の膜の膨張に対する膜のリザーバーとして機能することで細胞破裂を防いでいることが報告されたが、出芽酵母エイソソームの機能については未だ明らかになっていない。出芽酵母エイソソームには、合計 23 種類の膜結合タンパク質、輸送体、４回膜貫通タンパク質が局在することが知られており、これらは正常なエイソソーム構造の形成や機能維持に貢献していると考えられている。また、エイソソームには 6 種類の 4 回膜貫通タンパク質が存在し、それらは Sur7 family と Nce102 family に分けられる。それぞれのファミリータンパク質は互いに高い相同性を有しており(>61%)、重複した機能を持つことが推測されるが、これらの機能についてもほとんど明らかになっていない。

そこで、本研究ではこれら 6 つの 4 回膜貫通タンパク質をすべて欠損させた六重変異株を作製し、これらのタンパク質のエイソソームにおける機能の解析を試みた。しかし、六重変異株は顕著な表現型は見られず、これらの 4 回膜貫通タンパク質はエイソソーム構造形成や機能維持には必須でないことが示唆された。さらなる解析のためにエイソソーム構造形成に深く関わるとされる BAR ドメインを持つ Pil1 をさらに欠損させた七重変異株を作製した。Pil1 単独欠損株は“エイソソームレムナント”と呼ばれる大きな細胞膜の陥入構造が形成されるのに対し、六重変異株に Pil1 を欠損させた七重変異株ではエイソソームマーカータンパク質である Lsp1-GFP を用いた蛍光顕微鏡による観察ではエイソソーム構造がほぼ観察されなかった。また、七重変異株は高温・高浸透圧感受性を示し、その感受性は 6 つの 4 回膜貫通タンパク質の一つである Nce102 によっては回復しないのに対し、Sur7 または Pil1 を戻すことにより感受性の抑圧が見られた。このことから、Pil1 と Sur7 は協調的に働くことで、正常なエイソソーム形成やストレス適応に機能していることが考えられた。現在、Sur7 family タンパク質と Pil1 を欠損させた五重変異株を作製し、Sur7 family タンパク質のエイソソーム構造形成や機能維持への関与について解析を行っている。また、これら変異株の細胞表面構造について電子顕微鏡を用いた解析もしており、これらの結果についても合わせて報告したい。

MCC/Eisosome, stress response, tetraspanning membrane protein

講演番号：3C17p11
講演日時：3 月 19 日 16:50～ C 校舎 17 会場

# RNA 結合タンパク質 Byr3 は分裂酵母 Rad26 変異株のチェックポイント機能欠損を相補する
# RNA-binding protein Byr3 complement a checkpoint defect of Rad26 mutant

○脇田 健史[1]、井倉 毅[1]、古谷 寛治[2] ([1]京大、放生研、突然変異、[2]京大、放生研、放射線システム)
○Takeshi Wakida[1], Tsuyoshi Ikura[1], Kanji Furuya[2] ([1]Dpt. Mutagenesis, RBC, Kyoto Univ., [2]Dept. Rad. System, RBC, Kyoto Univ.)

ゲノム DNA に損傷を受けた細胞が細胞周期を一旦停止する時期をチェックポイントと呼び、その停止機構を DNA チェックポイント機構と呼ぶ。DNA チェックポイント機構は ATR を始めとする構成因子のリン酸化によるシグナル伝達により発動されるが、それを担うリン酸化酵素においては細胞周期以外の機能をもつ基質も多く含まれることから、DNA チェックポイント機構の様々な生命活動への関与が示唆されてきた。

本研究では、ATR キナーゼ複合体の制御サブユニット Rad26(ATR-interacting protein ortholog)に着目し、DNA チェックポイント機構における新規制御因子を見つけるため、Rad26 変異株の DNA 合成阻害剤への感受性を多コピーで相補する遺伝子の同定を試みた。得られた遺伝子クローンの中で感受性の相補能が最も強かったのは *byr3* であった。Byr3 は核小体と細胞質に局在する Zn フィンガータンパク質であり、出芽酵母オーソログである Gis２は RNA に結合し、主にリボソーム生合成に機能していることが示唆されていたものの、DNA チェックポイント機構に関与する報告はされていなかった。興味深いことに、Byr3 を多コピーで発現する Rad26 変異株では DNA 合成阻害剤の感受性だけでなく、チェックポイント停止異常の表現型も相補されており、DNA チェックポイント機構の下流因子である Chk1 キナーゼの活性の亢進も観察された。逆に、分裂酵母 Byr3 の遺伝子破壊株は DNA 合成阻害剤に強い感受性を示したことから Byr3 の DNA チェックポイント機構へのより直接的な関与も予想できた。以上の結果は、DNA チェックポイント機構がリボソーム生合成経路により調節を受けうることを示唆しており、今後は Byr3 の解析を進めることでその分子機構を明らかにしていきたい。

checkpoint, DNA damage, RNA-binding

発表責任者：脇田健史（twakida5963@gmail.com）

講演番号：3C17p12
講演日時：3 月 19 日 17:05～ C 校舎 17 会場

メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を用いたメタノールセンサー細胞の開発
Development of methanol cell sensor with the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*
○竹谷 友之、由里本 博也、阪井 康能（京大院農・応用生命）
○Tomoyuki TAKEYA, Hiroya YURIMOTO, Yasuyoshi SAKAI (Kyoto Univ.)

【目的】メタノール資化性酵母はメタノールによって特異的かつ強力に誘導されるプロモーターを有しており、その誘導の強さはメタノール濃度に依存する。我々は以前、メタノール資化性酵母 *Candida boidinii* のメタノール誘導性ジヒドロキシアセトンシンターゼ遺伝子（*DAS1*）プロモーターの下流に蛍光タンパク質 Venus をレポーター遺伝子として発現させることにより、固体培地中および植物葉上といった、ガスクロマトグラフィでは測定が困難な環境・生物試料のメタノールを定量する『メタノールセンサー細胞』の開発に成功し、その検出下限は 250 μM であった（*PLoS ONE* e25257, 2011）。本研究では、新たにメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を用いたメタノールセンサー細胞の開発、および用いるメタノール誘導性プロモーターの検討や測定条件の検討、ならびにメタノール代謝系の改変による検出感度の向上を目的とした。

【方法・結果】メタノール資化性酵母 *P. pastoris* のメタノール誘導性遺伝子 *DAS1* プロモーターの下流に、ペルオキシソーム局在化シグナル配列を付与した蛍光タンパク質 Venus-PTS1 を発現させた。この株をグルコースを炭素源として液体培養した後、メタノール濃度の異なる液体培地に移し、経時的に顕微鏡観察を行って Venus 蛍光を観察・定量化したところ、メタノール誘導開始後 4 時間後における蛍光強度がメタノール濃度と最もよく相関した。次にグルコースを炭素源とする前培養を対数増殖前期および対数増殖後期まで行い、培地シフト後の Venus 蛍光を比較したところ、前者の条件ではメタノールを含まない培地においても低濃度メタノール条件下と同程度の Venus 蛍光が観察されたのに対し、後者の条件ではメタノールを含まない培地においても Venus 蛍光の強度は低く抑えられていた。さらに後者の条件では *C. boidinii* のメタノールセンサー細胞よりも高感度の検出が可能であった。またメタノールの消費を遅らせ培地中濃度を保つことで検出感度を向上させることを企図し、メタノール代謝の第一段階を担うアルコールオキシダーゼ遺伝子（*AOX1*）を破壊した株を宿主としたが、この株では低濃度メタノール条件下で Venus-PTS1 の発現が誘導されなかった。以上の結果から、低濃度のメタノールを検知するためには、細胞によるメタノールの代謝が重要であることがわかった。複数のメタノール誘導性プロモーターについても同様の検討を行ったが、*DAS1* プロモーターが最も優れたメタノール応答性を示した。

Cell-based biosensor, Methylotrophic yeast, Environmental sensing

発表責任者：竹谷 友之（takeya.tomoyuki.35s@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3C17p13
講演日時：3 月 19 日 17:20～ C 校舎 17 会場

# 酵母に見出したフラボタンパク質 Tah18 依存的な一酸化窒素の合成制御機構と生理機能解析

# Regulatory mechanism of flavoprotein Tah18-dependent NO synthesis and cell death found in yeast

○吉川 雄樹、那須野 亮、渡辺 大輔、高木 博史（奈良先端大）
○Yuki YOSHIKAWA, Ryo NASUNO, Daisuke WATANABE, Hiroshi TAKAGI (NAIST)

【背景と目的】当研究室では、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、高温処理や過酸化水素処理などの酸化ストレスによってアルギニン依存的に一酸化窒素（NO）が合成され、この NO 合成酵素（NOS）様活性にフラボタンパク質の Tah18 が関与することを明らかにした。既知の NOS は NADPH からの電子の受け渡しを行なうレダクターゼドメインとアルギニンの結合・酸化を行なうオキシゲナーゼドメインから構成される。しかし、酵母には NOS のオルソログが存在せず、Tah18 には NOS 活性に必須のオキシゲナーゼドメインが欠落しており、Tah18 が関与する NO 合成機構には不明な点が多い。そこで本研究では、酸化ストレス応答的な NO 生成とその制御機構について解析した。
【方法と結果】まず、NO 特異的な蛍光プローブ DAF-FM DA を用いて酵母細胞内の NO 量を測定したところ、過酸化水素処理に応答してアルギニンから Tah18 依存的に NO が迅速に合成されることが示された。次に、Tah18 と相互作用する Dre2 タンパク質が酵母の NO 合成に及ぼす影響を検討した。ガラクトースにより Dre2 遺伝子の転写を誘導できる菌株をガラクトース培地での培養後、グルコース培地に交換して培養し、Dre2 タンパク質量と細胞内 NO 量を測定した。その結果、培養時間に伴い Dre2 タンパク質量が減少し、これに伴いガラクトース培地に交換したサンプルと比較して細胞内 NO 量が上昇した。しかし、野生株では NO 量の上昇は見られなかったことから、Dre2 は酵母の NOS 活性を阻害する可能性が示された。そこで、酵母が NO を合成する過酸化水素処理条件における Tah18 と Dre2 の相互作用を解析した。興味深いことに、Tah18-Dre2 複合体は過酸化水素処理後、速やかに解離した。これらの結果から、Tah18 と Dre2 の相互作用が NO 合成の抑制に重要であることが示された。さらに、Tah18 と Dre2 の相互作用の強化を目的として、Tah18 と Dre2 を人為的に融合させたタンパク質を発現する菌株を作製し、NO 合成量を測定した。Tah18-Dre2 融合株は、野生型株と比較して顕著に NO 合成量が低下した。これまでに、高濃度の過酸化水素処理に伴い、合成される NO が細胞死を誘導することが報告されている。そこで、Tah18-Dre2 融合発現株について、過酸化水素処理条件下における生存率を測定したところ、野生型株と比較して生存率が有意に回復した。以上の知見をもとに我々は「通常、Tah18 と Dre2 は複合体を形成することにより Tah18 依存的な NOS 活性を抑制しているが、酸化ストレスに応答して Tah18-Dre2 複合体が解離することにより、遊離した Tah18 に依存的な NO 合成が起こる。また、過剰量の NO が合成される条件では細胞死が誘導される。」という新規な NOS 活性の制御モデルを考えている。

Nitric Oxide, Tah18, cell death

発表責任者：吉川　雄樹（y-yoshikawa@bs.naist.jp）

講演番号：3C17p14
講演日時：3 月 19 日 17:35～ C 校舎 17 会場

# 出芽酵母プロテインキナーゼ C のリン酸化における Pkh1/Pkh2 と TORC2 の相関性

# Correlation between Pkh1/Pkh2 and TORC2 in phosphorylation of yeast protein kinase C

○今井 杏理紗[1]、野村 亘[2]、井上 善晴[1]（[1]京大院・農・応生科、[2]京大院・農・食品生物）
○Arisa IMAI[1], Wataru NOMURA[2], Yoshiharu INOUE[1] ([1]Div. of Appl. Life Sci., Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ., [2]Div. of Food Sci. & Biotechnol., Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ.)

出芽酵母のプロテインキナーゼ C（Pkc1）は AGC キナーゼファミリーに属するセリン・スレオニンキナーゼであり、下流の Mpk1 MAP キナーゼ経路を活性化し、アクチン細胞骨格の制御や細胞壁の健全性の維持など、様々な細胞内機能を持つ。これまでに我々は、Pkc1 は TOR complex 2（TORC2）によって $Thr^{1125}$ と $Ser^{1143}$ がリン酸化されること、さらに $Thr^{1125}$ のリン酸化は $Ser^{1143}$ のリン酸化レベル、ならびに Pkc1 自身のタンパク質の安定性に関与することなどを明らかにしてきた[1)]。一方、Pkc1 は Pkh1/Pkh2 により $Thr^{983}$ がリン酸化されることが知られている。今回、Pkc1 の $Thr^{983}$ の Ala 置換体では、$Thr^{1125}$ のリン酸化レベルが顕著に減少することを見いだした。このことから、Pkc1 の各リン酸化部位のリン酸化は、相互に影響しあっている可能性が考えられた。TORC2 は細胞膜の MCT（membrane compartment containing TORC2）と呼ばれる画分に、また Pkh1/Pkh2 は eisosome と呼ばれる画分に局在していることが知られている。そこで本研究では、Pkc1 のリン酸化の時空間的な制御機構の可能性について検討した。

Pkh1/Pkh2 による $Pkc1^{T983}$ のリン酸化が、TORC2 によるリン酸化に及ぼす影響を調べるため、*pkh1*$^{ts}$*pkh2*Δ株を用いて検討を行った。その結果、*pkh1*$^{ts}$*pkh2*Δ株を制限温度にシフトすると、$Thr^{983}$ のみならず、TORC2 によるリン酸化部位である $Thr^{1125}$ のリン酸化レベルも減少した。Pkh1/Pkh2 は eisosome の構成因子である Pil1 と Lsp1 に結合し、細胞膜への局在が維持されている。そこで、eisosome が崩壊することが報告されている *pil1*Δ株を用いて Pkh1/Pkh2-GFP の局在を観察したところ、野生株では細胞膜にドット状に観察されるのに対し、*pil1*Δ株ではドット状に局在している細胞が減少した。一方、*pil1*Δ株および *pkh1*$^{ts}$*pkh2*Δ株における TORC2 の局在は、いずれの株においても野生株と違いは見られなかった。このことから、Pil1 および Pkh1/Pkh2 は TORC2 の局在には関与しないと考えられた。次に、*pil1*Δ株および *pkh1*$^{ts}$*pkh2*Δ株における Pkc1 の局在について検討した。野生株では、Pkc1 は bud tip あるいは bud neck に観察されるが、*pkh1*$^{ts}$*pkh2*Δ株ではそれらの局在は消失し、Pkc1 は芽の細胞膜全体に沿って局在していた。一方、*pil1*Δ株では Pkc1 の bud tip の局在は消失したが、bud neck の局在は維持され、一部は芽の細胞膜全体に沿って局在していた。以上のことから、Pkh1/Pkh2 による Pkc1 の $Thr^{983}$ のリン酸化は、TORC2 による $Thr^{1125}$ のリン酸化レベルに影響を与えることが明らかとなった。また、Pkh1/Pkh2 は Pkc1 の局在に関与している可能性が示唆された。

[1)] Nomura, W. & Inoue, Y. (2015) *Mol. Cell. Biol.* **35**(7), 1269-1280.

TORC2, protein kinase C, eisosome

講演番号：3C17p15
講演日時：3 月 19 日 17:50～ C 校舎 17 会場

出芽酵母における TORC2-Pkc1 シグナル経路の活性化に関与する因子の探索
Screening for factors involved in TORC2-Pkc1 signaling pathway in Saccharomyces cerevisiae
○富本 千晶[1]、伊藤 有亮[1]、池田 佳代[1]、野村 亘[2]、井上 善晴[1] ([1]京大院・農・応生科、[2]京大院・農・食品生物)
○Chiaki TOMIMOTO[1], Yusuke ITO[1], Kayo IKEDA[1], Wataru NOMURA[2], Yoshiharu INOUE[1] ([1]Div. of Appl. Life Sci., Grad. Such. of Agric., Kyoto Univ., [2]Div. of Food Sci. & Biotechnol., Grad. Such. of Agric., Kyoto Univ.)

TOR（target of rapamycin）は真核生物において進化的に広く保存された Ser/Thr キナーゼで、細胞内で機能が異なる 2 種類の複合体（TORC1、TORC2）を形成する。われわれは、出芽酵母の TORC2 が解糖系から派生するメチルグリオキサール（MG）により活性化され、プロテインキナーゼ C（Pkc1）をリン酸化することをこれまでに明らかにしてきた[1)]。一方、Pkc1 は熱ショックストレスにより、低分子量 G タンパク質である Rho1 依存的にも活性化される（CWI = cell wall integrity 経路）。MG による TORC2 を介した Pkc1 の活性化と、熱ショックによる Rho1 を介した Pkc1 の活性化経路は独立しているが、TORC2-Pkc1 シグナル経路の活性化の詳細な分子機構についてはまだよく分かっていない。そこで本研究では、TORC2-Pkc1 シグナル経路の活性化に関与する因子の探索を行った。

Pkc1 の C1 領域に存在する 4 つの Cys 残基を Ser に置換した変異体（$Pkc1^{4C/S}$）では、Pkc1 の TORC2 によるリン酸化レベルが低下しており[1)]、TORC2 からのシグナル伝達が十分に起こらなくなる。一方、Pkc1 の構成的活性化変異体（$Pkc1^{R398P}$）の過剰発現は致死性を示すが、この変異体に TORC2 によるリン酸化部位（$Thr^{1125}$）の Ala 置換変異を加えた変異体（$Pkc1^{R398P\text{-}T1125A}$）や、$Pkc1^{R398P\text{-}4C/S}$ 変異体の過剰発現は致死性を示さなかったことから、TORC2 によるリン酸化が $Pkc1^{R398P}$ の過剰発現による致死性の発揮には必要であると考えられた。従って、$Pkc1^{R398P\text{-}4C/S}$ 変異体発現株にマルチコピーで致死性を与えるような遺伝子は、TORC2-Pkc1 シグナル経路に関与することが期待される。

*GAL* プロモーター下流に $PKC1^{R398P}$ を連結したプラスミドを持つ株に酵母のゲノムライブラリーを導入し、ガラクトース培地での致死性を指標としたスクリーニングを行ったところ、33 個のクローンを得た。次いで、$Pkc1^{4C/S}$ の TORC2 によるリン酸化部位のリン酸化レベルの回復を指標とした二次スクリーニングを行った結果、得られたクローンの一つに、スピンドル極体の構成因子である Cnm67 をコードする遺伝子を含むプラスミドが得られた。TORC2 の必須コンポーネントである Avo3 の温度感受性変異株（*avo3-30*）に *CNM67* 遺伝子をマルチコピーで導入すると、温度感受性が抑圧された。また、*cnm67*Δ 株は MG 感受性を示したが、温度感受性は示さなかった。さらに、Pkc1 下流の Mpk1 MAP キナーゼ経路の活性化に関して、*cnm67*Δ 株は熱ショックには応答したが、MG には応答しなかった。これらのことから、Cnm67 は CWI 経路ではなく、TORC2-Pkc1 シグナル経路に対し正に働く因子である可能性が強く示唆された。

[1)] Nomura, W. and Inoue, Y. (2015) *Mol. Cell. Biol.* **35**, 1269-1280.

yeast, TORC2, protein kinase C

講演番号：3C17p16
講演日時：3 月 19 日 18:05～ C 校舎 17 会場

TOR 複合体 2 シグナル経路の活性化における Cdc42 の役割
Role of Cdc42 in the activation of TOR complex 2 signaling pathway

○野村 亘[1,5]、後藤 剛[1,5]、高原 照直[2]、前田 達哉[3]、河田 照雄[1,5]、井上 善晴[4]（[1]京大院・農・食品生物、[2]名大院・生命農・応用分子生命科学、[3]東大・分生研、[4]京大院・農・応生科、[5]京大・生理化学研究ユニット）
○Wataru NOMURA[1,5], Tsuyoshi GOTO[1,5], Terunao TAKAHARA[2], Tatsuya MAEDA[3], Teruo KAWADA[1,5], Yoshiharu INOUE[4] ([1]Div. of Food Sci. & Biotechnol., Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ., [2]Dept. Appl. Mol. Biosci., Grad. Sch. Bioagric., Sci. Nagoya Univ., [3]Inst. of Mol. Cell. Biosci., Univ. of Tokyo, [4]Div. of Appl. Life Sci., Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ., [5]Research Unit for Physiological Chemistry)

TOR（Taget Of Rapamycin）は真核生物に保存されたタンパク質リン酸化酵素である。TOR は機能的に異なる 2 つの複合体（TOR 複合体 1：TORC1、TOR 複合体 2：TORC2）を形成することで機能を発揮し、細胞成長や代謝など、生育に必須なシグナル伝達経路を構成する。TORC1 シグナル経路はアミノ酸などにより活性化され、翻訳の制御やオートファジーの抑制などに機能する。また、その活性化機構に複数の低分子量 G タンパク質が関与することが明らかとなっている。一方、TORC2 シグナル経路において、出芽酵母の TORC2 は AGC キナーゼである Ypk1/2 や Pkc1 などを基質とし、脂質代謝や細胞骨格形成に寄与する。これまでに、TORC2 は細胞膜直下に局在することや、TORC2 シグナルが膜ストレスに応答することが分かっているが、TORC1 シグナル経路と比べると、TORC2 シグナル経路の制御機構については不明な部分が多い。

最近我々は、解糖系から派生する代謝物であるメチルグリオキサール（MG）が、酵母 TORC2 シグナル経路を活性化すること、またその活性化が動物細胞においても起こることを見出し、MG が酵母−哺乳動物間で共通した新規な TORC2 活性化因子として機能することを報告した（Mol. Cell. Biol. 2015）。また、TORC2 シグナル経路の不全株は MG に高い感受性を示した。今回我々は、TORC2 シグナルの制御に関与する因子の取得を目的として、特に TORC2 との関わりが期待される細胞膜に関連する因子に着目して、MG 感受性株の探索を行った。その結果、細胞膜を構成する主要なリン脂質の一つであるホスファチジルセリンの合成酵素をコードする *CHO1* の欠損株が、MG に対して高い感受性を示すことを見出した。さらに、*CHO1* 欠損株では TORC2 シグナルの活性化が抑制された。次に、ホスファチジルセリンにより局在制御を受けることが知られている低分子量 G タンパク質 Cdc42 に着目した。TORC2-Ypk シグナルは膜ストレスにより活性化するが、*CDC42* およびその GDP/GTP 交換因子である *CDC24* の変異株において、膜ストレスを惹起する薬剤である Aureobasidin A（AbA）による TORC2-Ypk シグナルの活性化が抑制された。また、Cdc42 の活性化を阻害する Rdi1 や、GTPase 活性化タンパク質である Rga1 の過剰発現によっても、AbA による TORC2-Ypk シグナルの活性化が抑制された。さらに、マウス脂肪細胞において、Cdc42 の阻害剤がインスリンによる mTORC2 シグナルの活性化を抑制することを見出した。以上のことは、Cdc42 が TORC2 シグナルの活性制御に関与することを強く示唆している。

TORC2, Cdc42, yeast

講演番号：3C18a01
講演日時：3 月 19 日 09:20～ C 校舎 18 会場

タイプ A トリコテセン生産菌の経路酵素遺伝子変異株の解析
Analysis of pathway enzyme gene mutants of type A trichothecene-producing strains
○田中 佑弥[1]、杉浦 涼介[1]、田中 彰[2]、前田 一行[1]、松井 宏介[2]、中嶋 佑一[1]、金丸 京子[1]、小林 哲夫[1]、安藤 直子[2]、木村 真[1]([1]名大農・生命農学、[2]東洋大工研・理工研)
○Yuya TANAKA[1], Ryosuke SUGIURA[1], Akira TANAKA[2], Kazuyuki MAEDA[1], Kosuke MATSUI[2], Yuichi NAKAJIMA[1], Kyoko KANAMARU[1], Tetsuo KOBAYASHI[1], Naoko ANDO[2], Makoto KIMURA[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Toyo Univ.)

【目的】
*Fusarium* 属菌は穀物に感染し、トリコテセン系かび毒を生産して食の安全を脅かす。近年、穀類から T-2 toxin を生産する *Fusarium sporotrichioides* や *F. langsethiae* が頻繁に単離されるようになっている。既に我が国でも規制対象となっているデオキシニバレノール（DON）は、ニバレノール生産菌 *Fusarium graminearum* の C-4 位水酸化酵素遺伝子 FgTri13 が変異し、機能を失うことによって進化したことが知られているが、T-2 toxin 生産菌でも Tri13 が非機能化した変異株が出現する可能性が否定できない。そこで *F. langsethiae* の FlTri13 を破壊し、どのような代謝物ができるのかを解析した。
【結果・考察】
FlTri13 破壊株の T-2 toxin 生合成経路は新たなシャント経路へ入ることを見出した。これまで *F. sporotrichioides* の FsTri13 破壊株では、C-4 位が水酸化されないまま反応が進み、4-deoxyT-2 toxin が主な生成物であると報告されていた（Brown ら 2002）が、C-4 位が未修飾のままでは C-8 位をイソバレリル化する FlTri16 の反応が進みにくいために 8-hydroxycalonectrin（8-HCA）がかなりの量蓄積することが明らかになった。さらに 8-HCA から C-15 位の脱アセチル化が優先的に起こり、15-deacetyl-8-hydroxycalonectrin（15-de-8-HCA）や 4-deoxy-15-deacetylT-2 toxin が蓄積することが明らかになった。以上の結果は、生産菌の進化によって、より複雑な新たなリスク要因が実際の圃場で出現する可能性を示唆するものである。この C-15 位脱アセチル化に関わる酵素遺伝子が Tri8 であるかについて、現在調査中である。
また、トリコテセン生成の最初のステップのファルネシルピロリン酸環化に関わる Tri5 を破壊した株へのフィーディング実験によって、8-HCA や 15-de-8-HCA のシャント化合物も正規の基質と同じように T-2 toxin に進むことが分かった。この結果から FlTri13 は A-ring の修飾の有無に関係なくトリコテセン骨格を基質として受け入れ、シャント化合物でも正規の基質と変わらない速さで進むことが示唆された。

Fusarium sporotrichioides, trichothecene, T-2 toxin

発表責任者：木村真（mkimura@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3C18a02
講演日時：3 月 19 日 09:35～ C 校舎 18 会場

# ダイズと *Bradyrhizobium diazoefficiens* との共生不和合性を誘導する 根粒菌 3 型分泌エフェクター
# Rhizobial type III effector inducing the symbiotic incompatibility between *Bradyrhizobium diazoefficiens* and soybean plants

○菅原 雅之[1]、岩野 裕也[1]、今道 仁[1]、高橋 智子[1]、佐藤 修正[1]、梅原 洋佐[2]、三井 久幸[1]、南澤 究[1] ([1]東北大生命、[2]農研機構)
○Masayuki Sugawara[1], Hiroya Iwano[1], Hitoshi Kondo[1], Satoko Takahashi[1], Shusei Sato[1], Yosuke Umehara[2], Hisayuki Mitsui[1], Kiwamu Minaisawa[1] ([1]Tohoku Univ., [2]NARO)

栽培ダイズ*Glycine max* (L.) Merr.には、*Rj*と呼ばれる特定のダイズ根粒菌による根粒形成を制御する遺伝型が複数存在する。そのうち*Rj2*遺伝型のダイズ品種は、根粒菌*Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA122株とその近縁細菌による根粒形成を特異的にキャンセルする。これまでにこの「共生不和合性」を引き起こす因子として、根粒菌USDA122株の3型タンパク質分泌系 (T3SS) とダイズのTIR-NBS-LRR型抵抗性Rタンパク質がそれぞれ同定されている。したがってUSDA122株の感染時にT3SSを介して打ち込まれるエフェクタータンパク質をダイズ側の免疫系が認識し、根粒形成を制限していると推測されている。本研究では*Rj2*共生不和合性の誘導にかかる分子機構をさらに理解するため、原因エフェクターの同定とその機能解析を行った。

はじめに原因エフェクターをコードする遺伝子を同定するため、USDA122株の*Rj2*共生不和合性を示さない突然変異株を単離し、そのドラフトゲノムからゲノム上の変異箇所を特定した。その結果、複数の変異株からBD122_09010遺伝子への挿入配列 (IS) の挿入が認められた。次に、新たにBD122_09010欠損変異株を作製し、Hardee (*Rj2*) に対する根粒形成能を調査したところ、野生株に比べ明らかに多数の成熟根粒の形成が認められた。また、USDA122細胞よりBD122_09010遺伝子産物がT3SS依存的に細胞外へ分泌されることを、ウエスタンブロッティングにより確認した。以上より、本遺伝子産物が*Rj2*共生不和合性を誘導するT3SSエフェクターであることが強く示唆された。

一方で、データベース検索の結果から、本遺伝子ホモログは*Rj2*ダイズに根粒を形成する「共生和合性」の菌株も含め、ほぼ全ての*Bradyrhizobium*属ダイズ根粒菌が共通して保有していることがわかった。しかし、USDA122のような不和合性菌株のアミノ酸配列において4つの特異的なアミノ酸残基が認められたため、配列が異なる和合性菌株USDA110と遺伝子交換を行い、Hardee (*Rj2*) に対する根粒形成能を調査した。その結果、本遺伝子のアミノ酸配列がUSDA122株タイプの場合にのみ、共生不和合性が誘導された。したがって、*Rj2*ダイズに対する共生特異性は、BD122_09010遺伝子のアミノ酸残基の違いが原因であることが明らかとなった。本会では加えて、BD122_09010エフェクターとRタンパク質間の相互作用についても報告する。

*Bradyrhizobium diazoefficiens*, Soybean, Type III secretion system

発表責任者：菅原　雅之（msugawara@ige.tohoku.ac.jp）

講演番号：3C18a03
講演日時：3 月 19 日 09:50～ C 校舎 18 会場

複製遺伝子 *repABC* を二つ具備する Ti プラスミドの各 *repABC* 領域の機能
Functional analysis of the redundant *repABC* loci in the bireplicon Ti plasmid.
○山本 真司、ビタ アグスティーナ、坂井 綾子、守口 和基、鈴木 克周（広大理）
○ Shinji Yamamoto, Agustina Vita, Ayako Sakai, Kazuki Moriguchi, Katsunori Suzuki (Hiroshima Univ.)

*Agrobacterium* 属細菌は双子葉植物に感染し、自身の持つ DNA の一部を感染植物細胞に導入するという特性を持つグラム陰性植物病原菌である。同細菌が持つ Ti プラスミドは植物の感染に必要な遺伝子の大半を含む約 200kbp の自己伝達型プラスミドで、複製遺伝子 *repABC* によって安定に維持されている。*repABC* はαプロテオバクテリアの複製遺伝子として広く存在し、Ti プラスミドだけでなく染色体 DNA や共生プラスミドにも見られる。この中には複数の *repABC* 領域を持つ *repABC* レプリコンも存在するが、それらの機能について多くは明らかになっていない。

本研究では、*A. tumefaciens* Bo542 株のもつ pTiBo542 および *A. vitis* S4 株の持つ pTiS4 という、それぞれ２つの *repABC* 領域を持つ Ti プラスミドについて、各 *repABC* 領域の複製維持機能について調べた。pTiBo542 上の２つの *repABC* 領域（$repABC1_{pTiBo542}$, $repABC2_{pTiBo542}$）と pTiS4 上の２つの *repABC* 領域（$repABC1_{pTiS4}$, $repABC2_{pTiS4}$）について、一方または両方を含む mini replicon を作成した。これらを *A. tumefaciens* C58C1 株に接合導入を試みたところ、$repABC2_{pTiBo542}$ および $repABC2_{pTiS4}$ のみをもつ mini replicon では形質転換体が得られず、これらは複製機能を有しないことが示唆された。上述４つの *repABC* 領域がコードする複製タンパク質(RepA, RepB, RepC)のアミノ酸配列および遺伝子間領域(*repB-repC*)の塩基配列についてアライメントを行い比較した結果、$repABC2_{pTiBo542}$ は各要素について incRh1 不和合性グループに属する Ti プラスミド（pTiC58 など）の *repABC* 領域と高い類似性相同性が確認された。従って pTiBo542 自身は incRh2 不和合性グループに属するが、$repABC2_{pTiBo542}$ によって incRh1 のプラスミドに対しても不和合性を示す可能性が示唆された。そこで $repABC2_{pTiBo542}$ をもたせた pBBR プラスミド(*pBBRori*)を incRh1 に属する pTiC58 をもつ C58 株に接合導入したところ、その形質転換体は全て pTiC58 を失っていた。従って $repABC2_{pTiBo542}$ は複製機能を有しないが incRh1 の *repABC* レプリコンに対して不和合性を発揮していることが示された。pTiBo542 上において $repABC1_{pTiBo542}$ は複製維持に機能する一方、$repABC2_{pTiBo542}$ は共存する incRh1 Ti プラスミドを排除する働きを持つことになる。pTiBo542 と incRh1 に属する Ti が宿主細胞内で共存する状況、例えば一方の Ti プラスミドが他方の Ti プラスミドをもつ細胞に接合導入された場合、pTiBo542 の２つの *repABC* 領域の存在によって一方的に incRh1 プラスミドは速やかに脱落する。宿主細胞にとっては両者を同時に維持する負担を軽減でき、pTiBo542 にとっては自身が維持されるのに役立っていると考えられる。

*repABC*, *Agrobacterium*, plasmid incompatibility

講演番号：3C18a04
講演日時：3 月 19 日 10:05～ C 校舎 18 会場

ランダム変異による *Thermococcus kodakarensis* 高温感受性株の単離と解析
Isolation and characterization of high temperature-sensitive mutants of *Thremococcus kodakarensis* by random mutagenesis.
○金子 瑛[1]、二石 涼平[1]、折田 和泉[1]、中村 聡[1]、今中 忠行[2]、福居 俊昭[1] ([1]東工大生命理工学院、[2]立命館大生命科学)
○Akira KANEKO[1], Ryohei FUTATSUISHI[1], Izumi ORITA[1], Satoshi NAKAMURA[1], Tadayuki IMANAKA[2], Toshiaki FUKUI[1] ([1]Tokyo Tech., [2]Ritsumeikan Univ.)

【背景・目的】超好熱菌の高い耐熱性を実現する機構は興味深く、多くの研究がなされてきた。高温環境下での生育にはタンパク質・核酸・脂質などの生体高分子の熱安定化が重要であることは明らかだが、そのために必要な遺伝子機能についての全貌は明らかではない。すでに多くの超好熱菌に関してゲノム解析が行われているものの、ゲノム情報のみでは超好熱菌の超好熱性や耐熱機構の理解には十分でない。我々は近年、*T. kodakarensis* 染色体上のランダムな位置にトランスポゾン領域を挿入する方法を確立した。このランダム変異ライブラリーから至適生育温度（85℃）より高温の 93℃での生育能が低下した高温感受性株のスクリーニングを行い、単離した変異株の解析を行った。
【方法】*T. kodakarensis* ランダム変異の宿主にはウラシル・アグマチン要求性、推定制限系遺伝子破壊株Δ2239 株（Δ*pyrF* Δ*pdaD* Δ*tk2239*）を使用した。固体培地上の変異体モノコロニーをピルビン酸含有人工海水栄養豊富培地（MA-YT-Pyr）を分注した 96 穴プレートで嫌気的に 85℃で培養を行った。その後レプリケーターによってコピーした２枚のプレートをそれぞれ 85℃と 93℃で培養し、93℃での生育能が低下した株を取得した。単離した変異株から抽出したゲノム DNA を切断・環状化し、大腸菌を形質転換してレスキューしたプラスミドまたはインバース PCR の産物を解析することでトランスポゾン領域が挿入された変位部位を同定した。遺伝子相補には構成的プロモーター$P_{pyrF}$を含むシャトルベクターpLCS を使用した。
【結果】約 2,000 クローンの *T. kodakarensis* ランダム変異体を対象に高温感受性のスクリーニングを行い、39 株の高温感受性株を得た。プラスミドレスキューもしくはインバース PCR 法によりトランスポゾン隣接領域を増幅し、シーケンシング解析を行ったところ、tRNA 修飾関連遺伝子が変位部位として多数同定された。また物質輸送関連遺伝子、代謝関連遺伝子などが同定された。
トランスポゾン領域が挿入された遺伝子ではなく、極性効果により発現が影響を受けた周辺遺伝子が表現型に影響を与える可能性があるため、遺伝子相補による検証を行った。変位部位について *T. kodakarensis* のゲノム DNA を鋳型に PCR で増幅した正常領域を挿入した相補ベクターを作製し、形質転換した相補株について 85℃および 93℃での液体培養における生育を測定した。現在までに 17 株について検討したところ、9 株は遺伝子相補によって高温生育能が回復した。このうち 6 株は tRNA 修飾関連遺伝子の変異株であり、耐熱性・超好熱性への tRNA 修飾関連遺伝子の関与が強く示唆された。現在、変異株の解析を進めている。

hyperthermophile, *Thermococcus kodakarensis*, random mutagenesis

講演番号：3C18a05
講演日時：3 月 19 日 10:20～ C 校舎 18 会場

# Complex formation and DNA-binding properties of probable regulatory proteins for chitin-assimilation genes in Thermococcus kodakarensis

○Junqi Yan[1], Yoshinari Nomura[1], Izumi Orita[1], Satoshi Nakamura[1], Tadayuki Imanaka[2], Toshiaki Fukui[1] ([1]Sch. Life Sci. & Technol, Tokyo Tech., [2]Coll.Life Sci.,Ritsumeikan Univ.)

【Introduction】The hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis* KOD1 has the ability to assimilate chitin, which is rather rare in hyperthermophiles. The genes related to the chitin metabolism in *T. kodakarensis* are clustered within a 13-kbp region. It has been demonstrated that the expression was induced by $GlcNAc_2$, a primary degradation product of extracellular chitin by chitinase. We have clarified that TK1762 (hypothetical protein) and TK1763 (PIN domain protein), encoded within the chitin-assimilation gene cluster, were involved in expression regulation for not only the chitin assimilation genes but also several other genes on the chromosome of *T. kodakarensis*. Although previous studies reported that some PIN domain proteins from bacteria, archaea, and eucarya have the function as DNase or RNase, we could not detect any nuclease activity for TK1763. While, another research group has found that TK0169 was a probable transcription regulator for the chitin-assimilation genes. This study focused on complex formation and DNA-binding properties of TK1762, TK1763, and TK0169 in order to obtain knowledge for the expression regulation of the chitin metabolism by these proteins in *T. kodakarensis.*

【Methods and Results】*T. kodakarensis* strains were anaerobically cultivated at 85˚C in an artificial seawater-based rich medium containing elemental sulfur. The chitin metabolism was induced by addition of 0.2% chitin-oligosaccharide mixture ($GlcNAc_{2\text{-}6}$) into the medium. The cell-free extracts of *T. kodakarensis* were developed by native PAGE, and TK1762 and TK1763 were detected by Western blot analysis using the specific antisera. The results showed that the intracellular amount of TK1762 and TK1763 were increased by addition of the inducer, and they formed a heterooligomeric complex within the cells.

The recombinant proteins of TK1762, TK1763, and TK0169 were produced by *E. coli*, and purified by heat treatment and anion exchange chromatography. Electrophoresis mobility shift assay (EMSA) was carried out for the recombinant proteins with a *tk1760-tk1761* intergenic promoter region. TK1762 had weak binding ability to the promoter region, and the binding affinity was enhanced by forming the heteromeric complex with TK1763. TK0169 aloneshowed DNA binding property with rather low specificity.

Further studies are now in progress for elucidation of functions of these proteins in expression regulation of the chitin-assimilation genes, such as evaluation of DNA-binding properties of the proteins when the three proteins were co-existed.

Thermococcus kodakarensis, chitin metabolism, complex formation and DNA-binding properties

講演番号：3C18a06
講演日時：3 月 19 日 10:45～ C 校舎 18 会場

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の *supF* 変異検出系の構築
Construction of a *supF*-based mutation detection system for extreme thermophile *Thermus thermophilus*

○外川 陽一郎[1]、塩谷 詩織[1]、布柴 達男[2]、平津 圭一郎[3]（[1]防衛大・理工研・応化、[2]国基大、[3]防衛大・応化）
○Yoichiro TOGAWA[1], Shiori SHIOTANI[1], Tatsuo NUNOSHIBA[2], Keiichiro HIRATSU[3]（[1]NDA Grad. Sch., [2]ICU, [3]NDA App. Chem.）

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* は、65℃～75℃の高温を生育最適温度とするグラム陰性菌である。高温環境は、加水分解性の DNA 損傷を促進して突然変異を誘発する要因であるため、*T. thermophilus* がどのようなメカニズムでゲノム情報を維持しているかを解明することは、生物の高温適応や進化を理解する上で重要である。ゲノム維持・安定化機構の解明には突然変異の解析は非常に有効な研究手法だが、高度好熱菌では幅広い突然変異スペクトルを検出できる実験系は確立されていない。そこで当研究室では他の生物種で実績のある *supF* 変異検出系の改良を行い、*T. thermophilus* で使用可能な突然変異検出系を構築した。

本研究では、*supF* 変異検出系構築のために *T. thermophilus* HB27 株（野生株）と変異検出用大腸菌 KS40/pOF105 株の双方で複製可能な *supF* シャトルベクターpSK3 を作製した。これを用いて 70℃で培養した HB27 株の変異検出実験を行ったところ、一塩基置換、欠失変異、及び IS 挿入が検出された。この結果を大腸菌と比較すると、変異率（HB27：$1.9\times10^{-7}$、大腸菌：$2.4\times10^{-7}$ Nunoshiba et al. 1999）は同程度であったが、変異スペクトルの違いが確認された。具体的に一塩基置換においては、大腸菌の自然突然変異は G：C→C：G が主要な変異（46%）であったのに対し、*T. thermophilus* では G:C→T:A が 50%で最多であった。これらの結果から、 *T. thermophilus* は高温環境下においても他の生物種と同程度のゲノム安定性を維持している事が明らかになった。さらに、変異スペクトル解析結果はそのゲノム維持・安定化機構が大腸菌とは異なる可能性を示唆した。

自然突然変異が検出できたのでさらなる検証実験を行うため、現在我々は *udgA udgB* 二重欠損破壊株の作製中である。*udgA* 及び *udgB* はウラシル DNA グリコシラーゼをコードし、その二重欠損株は DNA 鎖中のシトシンの脱アミノ化により生成するウラシルが除去できない。その結果として *T. thermophilus* の *udgAB* 欠損株では野生株と比べて、$His^+$復帰変異突然変異検出系において G：C→A：T 変異が 56 倍に増加する事が報告されている（Sakai et al. 2008)。本大会では、本変異検出系の有効性について、*udgAB* 二重破壊株の変異解析結果も併せて検証して報告する予定である。

*Thermus thermophilus*, *supF*

講演番号：3C18a07
講演日時：3 月 19 日 11:00～ C 校舎 18 会場

Thermus thermophilus HB27 における VapBC Toxin-Antotxin System の機能解析
Analysis of VapBC Toxin-Antitoxin System in a Thermophilic Bacterium Thermus thermophilus HB27
○Fan Yuqi、星野 貴行、中村 顕（筑波大）
○Yuqi Fan, Takayuki Hoshino, Akira Nakamura (University of Tsukuba)

【目的】多くのバクテリアは多様な toxin-antitoxin (TA) system を保有しており、特に VapBC は多くの生物でゲノム上に一番数多く存在する TA ファミリーとして近年注目されている。*T. thermophilus* HB27 株ゲノム中には既知の VapC toxin と相同性を示す四つの遺伝子(TTC0113, TTC0125, TTC1207, TTC1804)が存在するが、これらの遺伝子の機能に関する報告はなされていなかった。我々は大腸菌を宿主とした発現実験の結果から、これらの VapBC のうち TTC0125 VapC toxin と TTC0126 VapB antitoxin が TA system として機能していることを明らかにし、さらに生化学的な解析により TTC0125 が free RNA に対するリボヌクレアーゼ活性を有し、mRNA を分解することにより翻訳を阻害することを明らかにした。このように TTC0125 の酵素活性は解明されたが、細胞内の生理機能については明らかになっていない。VapBC TA system は抗生物質やストレスの存在下で菌の増殖を阻害し、細胞を persistence の状態に導く役割を担っていることが報告されている。また、VapBC system の欠損は菌の表現型に影響を与えないという報告が多数なされている。そこで本研究では、TTC0125-TTC0126 locus の生理機能の解明を試みた。
【方法及び結果】様々なストレスや低濃度の抗生物質存在下での増殖や生存に対して、TTC0125 破壊が与える影響を検討するため、各ストレスを引き起こす試薬の MIC を調べたうえで、野生株および各破壊株を MIC 濃度付近の薬剤を含む条件下で一晩培養した。TTC0125 破壊株、および TTC0126-TTC125 二重破壊株は酸化ストレスと浸透圧に対する感受性は変化しなかったが、カナマイシンに対しては野生株と比べて耐性を示した。この結果から *T. thermophilus* では、VapBC は persistetence に関与するだけではなく、他の生理機能も担っていることが示唆された。他のバクテリアの VapBC とは異なり、TTC0125-TTC0126 はゲノム上で glyoxylate, malate 代謝に関わる遺伝子群とオペロン(TTC0130-TTC0124)を形成している点が特徴的である。これらの代謝酵素の基質と推定される化合物である glyoxylate、malate を培地に添加すると、各株のストレス抵抗性が上昇した。またオペロンを構成する TTC0128 (2-hydroxy acid oxidase）を欠損した株は強いカナマイシン耐性を示し、カナマイシン添加によりオペロンを構成する遺伝子群の発現量が変化したことから、このオペロンがストレス応答に関与することが示唆された。さらに TTC0128 の単独破壊株が示したカナマイシン耐性の表現型は、TTC0125 との二重破壊株では認められなかった。このことは、オペロンを構成する代謝酵素遺伝子と TTC0125-TTC0126 の間に機能的な関連があることを示唆している。

toxin-antotixn system, VapBC, Thermus thermophilus

発表責任者：Nakamura Akira（nakamura.akira.fm@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3C18a08
講演日時：3 月 19 日 11:15～ C 校舎 18 会場

# Mrp アンチポーターにおけるイオン選択性と輸送サブユニットの同定
# Identification of ion selectivity and transport subunits in the Mrp antiporter

○松井 光恵、伊藤 政博（東洋大院 生命科学）
○Mitsue MATSUI, Masahiro ITO (Graduate school of Life Sciences Toyo University)

【背景・目的】

Mrp（**M**ultiple **r**esistance and **p**H adaptation）アンチポーターはカチオン／プロトンアンチポーターとして機能し、細胞内における pH とカチオン濃度のホメオスタシスを担う酵素である。また、Mrp アンチポーターは真正細菌や古細菌に幅広く分布している。これまでの研究から Mrp を欠損した緑膿菌がマウスに対する感染力の低下を引き起こすことや、黄色ブドウ球菌の Mrp アンチポーターが多剤耐性菌の薬剤ターゲットタンパク質の一つとして期待されている。これまでに自然界から $Na^+/H^+$型、$K^+/H^+$型そして $Ca^{2+}/H^+$型の Mrp アンチポーターが発見されている。しかし、Mrp アンチポーターの機能を理解する上で、そのイオン選択性と輸送経路の解明が期待されているが、その詳細は不明のままである。Mrp アンチポーターは 7 つの ORF からなる 1 つのオペロンで構成され、アンチポーター活性にはすべての遺伝子産物（MrpABCDEFG）が必須であることが報告されている。特に MrpA と MrpD サブユニットは呼吸鎖複合体 I のプロトンの輸送に関与する NuoL、NuoM、NuoN サブユニットと相同性がある。そこで本研究では、NuoL、NuoM、NuoN サブユニットと相同性がある MrpA、MrpD サブユニットに着目して Mrp アンチポーターの共役イオンの選択性と輸送機構の解明を試みた。

【実験・結果】

本研究では好アルカリ性細菌 *Bacillus pseudofirmus* OF4 株（以下、BP 株）のもつ $Na^+/H^+$型 Mrp アンチポーターと *Thremomicrobium roseum* DMS5159 株（以下 TR 株）のもつ $Ca^{2+}/H^+$型 Mrp アンチポーターをターゲットとし、BP 株の *mrp* オペロンをベースに *mrpA*、*mrpD* 遺伝子をそれぞれ TR 株の *mrpA*、*mrpD* 遺伝子に置換したプラスミドを構築し、大腸菌内で発現させた場合に基質となる共役イオンの特異性が変化するかを観察した。その結果、BP 株の MrpA サブユニットを TR 株の MrpA サブユニットに置換した時、基質特異性に変化がみられる結果を得た。

【考察・今後の展望】

今回の結果より、Mrp アンチポーターにおけるカチオン選択と輸送に MrpA サブユニットだけでなく、MrpA、MrpD の両サブユニットが関与していることが推察された。また、今後は MrpA、MrpD サブユニットのカチオン輸送経路と想定している MrpA サブユニットの 5 番目の膜貫通領域と MrpD サブユニットの 12 番目の膜貫通領域に着目し、カチオン選択性に重要なアミノ酸残基の特定を試みる予定である。

Antiporter, selectivity, alkaliphilic bacillus

講演番号：3C18a09
講演日時：3 月 19 日 11:30～ C 校舎 18 会場

# $Na^+$と $K^+$を共役イオンとして回転するハイブリッド型べん毛モーター固定子のイオン選択機構の解明

# A functional analysis of hybrid stator complex of flagellar motor from *Bacillus trypoxylicola*

○長縄 俊、今澤 陸、伊藤 政博（東洋大院 生命科学）
○Shun NAGANAWA, Riku IMAZAWA, Masahiro ITO (Life Sciences, Toyo Univ.)

細菌のべん毛モーターは回転子と固定子から構成されている。固定子は、2 つのサブユニットからなり、イオンチャネルとして機能している。固定子の種類としては、$H^+$駆動型固定子 MotAB、$Na^+$駆動型固定子 MotPS、PomAB が知られている。好アルカリ性 *Bacillus alcalophilus* (BA 株)の固定子 MotPS は、共役イオンとして $Na^+$以外にも $K^+$を利用できるハイブリッド型べん毛モーターの初めての報告例であり、BA 株以外に共役イオンとして $K^+$を利用できる細菌は報告されていない。固定子のイオン選択性には、一回膜貫通型の膜タンパク質である MotB 型（MotS、PomB）サブユニットが特に重要であると考えられているが、共役イオン選択透過機構の詳細については不明な点が多い。MotB 型サブユニットの膜貫通領域内にはイオン選択性に重要だと考えられるアミノ酸残基が保存されており、$Na^+$駆動型ではロイシン残基が高度に保存されている。しかし、$Na^+$&$K^+$駆動型である BA 株の MotS では同じ位置にロイシン残基ではなくメチオニン残基が位置しており、このメチオニン残基が共役イオンとして $K^+$を選択するのに重要であると考えられている。

カブトムシの幼虫の腸内から単離された好アルカリ性 *Bacillus trypoxylicola* (BT 株)は生育に $K^+$を要求し、その固定子 MotPS は、$Na^+$&$K^+$駆動型であった。BT 株の MotPS のアミノ酸配列を取得したところ、MotS サブユニットにおいてイオン選択性に重要だと考えられるアミノ酸残基の位置には $Na^+$駆動型に重要なロイシン残基が位置していた。このことから、BT 株のべん毛モーターの $K^+$選択性には、BA 株とは異なった選択様式が存在することが考えられた。本研究では、MotS サブユニットとイオンチャネルを形成する MotP サブユニットに着目し、BT 株のべん毛モーター固定子における $K^+$選択機構ついて明らかにすることを試みた。

BT 株の固定子 MotP サブユニット（BT-MotP）と他の *Bacillus* 属細菌がもつ MotP サブユニットのアミノ酸配列を比較することで BT-MotP に特異的なアミノ酸残基の特定を行った。また、特定したアミノ酸残基を $Na^+$駆動型のアミノ酸残基になるように変異を導入した固定子遺伝子を作製した。作製した変異型固定子遺伝子を大腸菌の固定子欠損株（Δ*motAB*）に導入し、変異型固定子を発現する変異株を構築した。構築した変異株の運動解析を行うことで導入した変異によるイオン選択性への影響を調べた。更に、大腸菌の $K^+$取り込み系欠損株に変異型固定子を発現させた株を構築し、この株を用いて $K^+$添加量を制限して生育実験を行い、変異型固定子が機能することにより $K^+$の細胞内への取り込み量及び生育に変化が現れるかを実験した。結果の詳細は発表時に報告する。

flagellar motor, alkaliphilic *Bacillus*, Potassium ion

講演番号：3C18a10
講演日時：3 月 19 日 11:45～ C 校舎 18 会場

*Microbacterium* sp. TS-1 の $Cs^+$排出機構に関わるアンチポーターの同定
Identification antiporters which involved in $Cs^+$ efflux in *Microbacterium* sp. TS-1
○金田 悠里、伊藤 政博（東洋大学 生命科学）
○Yuri KANEDA, Masahiro ITO (Life Sciences, Toyo Univ.)

セシウム（Cs）はアルカリ金属の一種で、同位体（Cs134、Cs137）は放射性核種であり、放射能汚染の主要な原因として注目されている。一般に、$Cs^+$は細菌の生育に有害であることが知られているが、ハエトリグモから単離された好アルカリ性細菌 *Microbacterium* sp. TS-1（以後 TS-1）は 50mM 程度の塩化セシウム存在下で良好に生育することが知られていた。そこで、本研究では TS-1 株の $Cs^+$耐性評価とその耐性機構を明らかにすることを目的とした。

まず 50 mM～1.5 M の CsCl を添加した Tris 培地と天然培地で TS-1 株、大腸菌、枯草菌を 30℃で培養し、24 時間後の濁度を測定した。その結果、TS-1 株は、1 M CsCl という高濃度 CsCl を含む培地でも生育することが分かった。大腸菌や枯草菌はどちらも 100 mM CsCl を含む培地での生育が阻害された。これまで報告された CsCl に対するセシウム耐性菌の生育上限濃度は、400 mM 程度であることから、TS-1 株は高濃度セシウム耐性菌であることが示唆された。

TS-1 株のセシウム耐性機構は、主に 2 つの機構が推定された。まず一つ目は、細胞内に流入した $Cs^+$を細胞外に排出して細胞内の $Cs^+$濃度を低く維持する機構、二つ目は、細胞内に流入した $Cs^+$濃度がある程度上昇しても細胞が耐えられる機構である。そこで、まず TS-1 株のカチオンを排出する輸送タンパク質に着目した。輸送タンパク質はどの生物種にも普遍的に存在し、中でもカチオン/ $H^+$アンチポーターは細胞内ホメオスタシスにとって重要な役割を担っている。特に好アルカリ性細菌では、$Na^+$/ $H^+$アンチポーターが細胞内への $H^+$の取込みと細胞内へ流入した $Na^+$の排出を行う経路としてアルカリ環境適応に不可欠な膜内在性タンパク質として知られている。TS-1 株の全ゲノム情報からカチオン/ $H^+$ アンチポーター候補が 7 つ同定された。それら遺伝子領域を大腸菌の発現ベクターへクローニングした。現在、目的遺伝子領域を含んだプラスミドを大腸菌の主要な $Na^+/H^+$アンチポーターが欠損した株に形質転換し、形質転換体から調製した反転膜小胞を用いてカチオン/$H^+$アンチポート活性測定を行っている。結果の詳細は、発表にて報告する。

cesium, antiporter, alkaliphic bacteria

講演番号：3C18p01
講演日時：3 月 19 日 14:00～ C 校舎 18 会場

*Lactobacillus paracasei* EG9 株におけるプラスミド喪失と生育特性への影響
Plasmid lost of *Lactobacillus paracasei* EG9 and its effects on growth characteristics

○朝比奈 唯[1,2]、萩 達朗[2]、田島 淳史[1]、城間 安紀乃[3]、保 日奈子[3]、安次嶺 典子[3]、下地 真紀子[3]、新里 美寿々[3]、南 茉緯子[3]、中野 和真[3]、大木 駿[3]、中西 哲大[3]、照屋 邦子[3]、佐藤 万仁[3]、平野 隆[3]、鈴木 チセ[2]、守谷 直子[2]、小林 美穂[2]、野村 将[2]（[1]筑波大院・生命環境、[2]農研機構畜産研、[3]（一社）沖縄綜研）
○Yui ASAHNA[1,2], Tatsuro HAGI[2], Atsushi TAJIMA[1], Akino SHIROMA[3], Hinako TAMOTSU[3], Noriko ASHIMINE[3], Makiko SHIMOJI[3], Misuzu SHINZATO[3], Maiko MINAMI[3], Kazuma NAKANO[3], Shun OHKI[3], Tetsuhiro NAKANISHI[3], Kuniko TERUYA[3], Kazuhito SATOU[3], Takashi HIRANO[3], Chise SUZUKI[2], Naoko MORIYA[2], Miho KOBAYASHI[2], Masaru NOMURA[2]
([1]Grad. School of Life and Environm. Sci., Univ. of Tsukuba, [2]Institute of Livestock and Grassland Science, NARO, [3]Okinawa Institute of Advanced Science)

[目的] 乳酸菌は他のバクテリアと同様に、プラスミドの取り込みによって自身の形質を変化させることができ、また環境条件によってプラスミドを喪失することがある。乳酸菌のプラスミドにはラクトース資化、プロテアーゼ産生、バクテリオシン産生、ファージ耐性等の有用形質がコードされているものがあるため、プラスミドの保有状態が産業に与える影響は大きい。*Lactobacillus paracasei* EG9 株は、熟成チーズ中から非スターター性乳酸菌として分離された株であり、79kb、55kb、12kb の 3 種のプラスミドを保有している(未発表)。本株は MRS 液体培地で低温かつ塩存在下での生育に優れ、また単独では脱脂乳で生育しないにも関わらずチーズの熟成中にアミノ酸の遊離を促進させることから、製造時に添加することでチーズの熟成期間を短縮できる可能性を持つ。この EG9 株を MRS 液体培地を用いて継代したところ、生育速度や到達濁度等の生育特性が安定しなくなる現象が観察された。本研究では、この培養物中の菌株のプラスミド解析を行い EG9 株のプラスミドの安定性の検証と、得られたプラスミド変異株の生育特性を調べた。[方法]EG9 株の培養には MRS 培地を用いた。EG9 株の 3 種のプラスミド配列からそれぞれを検出可能なプライマーを設計し、マルチプレックス PCR によりプラスミドを検出した。[結果]生育特性が変化した培養液を MRS 寒天に塗布し、30℃、3 日培養した。生じたコロニーのプラスミド保有状態を調べたところ、保有プラスミドの組み合わせが異なる EG9 株のプラスミド変異株が存在していた。そこで 3 種のプラスミドをすべて保有する株(P1)のコロニー3 個をそれぞれ 0.85% NaCl 1ml に懸濁して MRS 液体培地 5mL に 1%接種し、30℃、1 日培養後、MRS 寒天 3 枚にそれぞれ塗布し 30℃で 2 日培養した。各寒天培地上に生じたコロニーをランダムに 16 個ずつ選択しプラスミド保有状態を調べたところ、16 個中 7~12 個のコロニーでプラスミドの喪失が見られた。特定のプラスミドを喪失するのではなく、3 種をランダムに喪失していた。そこで P1 を 30℃または 37℃で継代培養し、保有プラスミドの組合せが異なる 8 種類のプラスミド変異株を得た。これらのことから、EG9 株は 30℃または 37℃で培養することにより容易にプラスミドを喪失することが示された。得られた 8 種類のバリアントを 30℃で前培養後、予冷した 0%または 1.7% NaCl を含む MRS 液体培地に 1%接種して 10℃で培養し、経時的に濁度(OD620)を測定して生育曲線を作成した。その結果、バリアントによって到達濁度や塩存在下の反応に差異が見られた。これにより、EG9 株のプラスミド変異株はチーズの熟成条件である低温・塩存在下で、それぞれ異なる生育特性を示すことが明らかになった。

lactic acid bacteria, *Lactobacillus paracasei*, plasmid lost

発表責任者：小林美穂（mihokoba@affrc.go.jp）

講演番号：3C18p02
講演日時：3 月 19 日 14:15～ C 校舎 18 会場

# 消化管における生存と定着に寄与するビフィズス菌遺伝子の探索系の構築

# Development of a screening system for bifidobacterial genes that contribute to survival and colonization in the gastrointestinal tract

中川路 伸吾[1]、中島 森[1]、阪中 幹祥[2]、小椋 義俊[3]、林 哲也[3]、横田 篤[1]、○吹谷 智[1] ([1]北大農、[2]石川県大、[3]九大医)

Shingo NAKAKAWAJI[1], Shin NAKAJIMA[1], Mikiyasu SAKANAKA[2], Yoshitoshi OGURA[3], Tetsuya HAYASHI[3], Atsushi YOKOTA[1], ○ Satoru FUKIYA[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Ishikawa Prefectural Univ., [3]Kyushu Univ.)

## 【背景と目的】

プロバイオティクスとして摂取したビフィズス菌がヒトに有用効果を与えるためには，胃や小腸を通過する間生存状態を維持し，大腸で定着する必要がある．そのため，これらの生存と定着の分子機構を解明することは非常に重要である．そこで我々は，ビフィズス菌の消化管における生存と定着に寄与している遺伝子を特定することを目指している．その方法として，トランスポゾン変異導入系を用いて作製したビフィズス菌の変異株ライブラリーをマウスに投与し, INSeq (Insertion-sequencing) 法[1)]を用いて投与後のライブラリー中の各変異株の増減を評価することで，目的の遺伝子を探索することとした．本研究では探索系の構築に向けて，様々な生物種で利用されている転移因子 Himar1C9 を用いて，新たなトランスポゾン変異導入系の確立と変異株ライブラリーの作製を検討した．

## 【実験方法】

*Bifidobacterium longum* 105-A（105-A 株）を宿主株として，トランスポゾン変異株の取得を試みた．

Himar1C9 の転移酵素遺伝子を含むビフィズス菌で複製可能なベクターを 105-A 株に導入し，4%キシロース存在下で培養することで転移酵素の発現を誘導した．この菌体に「転移酵素の標的配列である逆位反復配列（Inverted Repeat, IR）にスペクチノマイシン耐性遺伝子（$Sp^R$）が挟まれたトランスポゾン（IR-$Sp^R$-IR)」を含むビフィズス菌で複製されないベクターを導入し，スペクチノマイシン含有寒天培地で IR-$Sp^R$-IR が 105-A 株のゲノム上に転移したトランスポゾン変異株を選抜した．得られた変異株約 1,500 株を次世代シークエンサーMiSeq に供し，IR-$Sp^R$-IR の転移領域を決定した．

## 【結果と考察】

IR-$Sp^R$-IR を含むベクターを転移酵素発現株に導入した結果，平均 144 変異株/μg DNA の効率でトランスポゾン変異株の取得に成功した．次世代シークエンサーMiSeq を用いた転移領域の網羅的な解析の結果，転移領域は 105-A 株の染色体 DNA 上に偏りなく分布していることが示唆された．

以上から，本トランスポゾン変異導入系は，105-A 株の遺伝子に網羅的に変異を導入することができると考えられた．現在は変異株数をさらに増加させて同様の検証を行っており，検証が完了し次第，INSeq 法を用いて消化管における生存と定着に寄与するビフィズス菌遺伝子を特定する予定である．

## 【参考文献】

1) Goodman *et al*., *Cell Host Microbe*, **6,** 279–289 (2009).

bifidobacteria, transposon mutagenesis, INSeq

発表責任者：吹谷 智（s-fukiya@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：3C18p03
講演日時：3 月 19 日 14:30～ C 校舎 18 会場

*Lactobacillus casei* が有する免疫誘導分子の探索系の構築
Development of a screening system for the immune activation of *Lactobacillus casei*
○関根 侑[1]、野口 実莉[2]、石浜 峻[1]、桝田 和彌[1,3]、梶川 揚申[2]、横田 健治[2]、五十君 靜信[2] ([1]東農大院・農化、[2]東農大・生応科、[3]国立医薬品食品衛生研究所)
○Susumu SEKINE[1], Minori NOGUTHI[2], Shun ISHIHAMA[1], Kazuya MASUDA[1,3], Akinobu KAJIKAWA[2], Kenji YOKOTA[2], Shizunobu IGIMI[2] ([1]Biol.Chem,Tokyo Univ.Agr., [2]Dept.Appl.Biol.Chem,Tokyo Univ.Agr., [3]National Institute of Health Science)

＜背景・目的＞
当研究室では *Lactobacillus casei* IGM393 株の免疫誘導分子を探索するため、Transposon 変異による変異株の作出、親株との比較による免疫誘導低下株のスクリーニング、及び遺伝子解析による新規分子の特定を試みてきた。しかしながら、当該菌株においてこれまで汎用されてきた従来型の Transposon は正常に機能しておらず、作出した変異株を用いた探索は困難であった。そこで、今回新たな Transposon を用いることで、IGM393 株が有する免疫誘導能分子の探索系の構築を試みた。
＜実験方法＞
本研究では、TA 配列を認識するノサシバエ由来の Transposon である *Himar1*C9[1)] を用いる。まず、温度感受性ベクターの pBT2 にマンニトール存在下で活性化するα-amylase promoter(*P*$_{amy}$)、*Himar1*C9 の転移酵素遺伝子(*tnp*)、tnp の認識部位である反復配列(IR 配列)にエリスロマイシン耐性遺伝子(*Em*$^r$)が挟まれた Transposon 配列(IR-*Em*$^r$-IR)を導入し、pBT2::*P*$_{amy}$-*Himar1*C9 を作成した。このベクターを IGM393 株の派生株であり、形質転換効率の高い *L. casei* IGM394 株に導入した。次に、LCM 培地(1%マンニトール含有)で培養することで *tnp* 発現を誘導し、Transposon 挿入株の作出を行った。挿入の確認はコロニーPCR、サザンハイブリダイゼーションにより評価した。免疫誘導能については、マウス由来マクロファージ細胞である RAW264.7 と親株、または変異株を 24 時間共培養し、培養上清中の TNF-α量を ELISA 法により定量することで評価した。
＜結果＞
LCM 培地で培養し、*tnp* の発現を誘導することで、これまでに約 200 株の変異株の作出に成功した。また、コロニーPCR、サザンハイブリダイゼーションにより、プラスミドの脱落及び、Transposon の挿入を確認することができた。いくつかの変異株については遺伝子解析により、挿入部位の特定をすることができた。以上の結果から、今回開発した Transposon を用いた探索系は変異株ライブラリーの作出に有用であると考えられる。現在、作出した変異株について、親株との TNF-α誘導能を比較し、誘導能が低下した株のスクリーニングを試みている。
＜関連文献＞
1) Lampe DJ *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA(1999)

Transposon, *Lactobacillus*, immune activation

講演番号：3C18p04
講演日時：3 月 19 日 14:45～ C 校舎 18 会場

Elucidation of the roles of sirtuin in *Lactobacillus paracasei*

○Glaezel Angelique Torres[1], Aiko Hirata[2], Akinobu Kajikawa[3], Shinji Kawasaki[4], Akihito Endo[1], Junichi Nakagawa[1] ([1]Graduate School of Bioindustry, Tokyo University of Agriculture, [2]Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, [3]Department of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture, [4]Department of Bioscience, Tokyo University of Agriculture)

**Purpose:** Sirtuin is known as longevity gene. In eukaryotes, it has been shown to have an enzymatic activity of $NAD^+$-dependent protein deacetylation targeting acetylated proteins. The existence of sirtuin homolog was confirmed in *Lactobacillus paracasei* BL23 (LpSirA), which may have a role in controlling protein synthesis (Atarashi et al, 2016). This study aims to elucidate other possible role(s) of sirtuin using *L. paracasei* BL23 with different expression levels of sirtuin by comparing the acetylated protein patterns of this organism and intracellular localization of LpSirA.

**Methods:** *L. paracasei* BL23 wild type, wild type with empty plasmid, sirtuin high expressor, sirtuin dominant negative and deletion mutant were used for the different analyses in this study. Intracellular localization was determined using 3 different approaches - immunofluorescence, sirtuin-venus fusion (GFP) and immunogold electron microscopy whereas acetylated protein patterns were determined using Western Blot analysis.

**Results:** Intracellular localization showed that LpSirA protein was localized at cell division plates, cell poles and in some instances in spiral like structures along the cells. Acetylated protein pattern revealed putative acetylated protein targets. Localization and identity of putative acetylated protein targets based on approximate molecular size indicate that sirtuin may also have roles in cell division and cell shape regulation. Further, cellular morphology revealed that levels of sirtuin may affect cell shape as shown in microscopic analysis wherein high expressor exhibited tendency to form long cells whereas deletion mutant exhibited tendency to form short cells in comparison with the wild type.

**Conclusion:** Results of these analyses suggest that LpSirA may also have roles in cell division and cell shape regulation of *L. paracasei* BL23.

**Reference:** H. Atarashi et al (2016). Identification of Sirtuin and Its Target as the Ribosomal Protein S4 in *Lactobacillus paracasei. J Gen Appl Microbiol.* 62:98-105.

Sirtuin, Intracellular localization, *L. paracasei*

発表責任者：中川　純一（j3nakaga@bioindustry.nodai.ac.jp）

講演番号：3C18p05
講演日時：3 月 19 日 15:00～ C 校舎 18 会場

*Bifidobacterium bifidum* におけるシアリダーゼは宿主との相互作用を促進し糖の資化をサポートする

The extracellular sialidase from *Bifidobacterium bifidum* promotes bacterium-host interactions and supports the assimilation of carbohydrates

○西山 啓太[1]、山本 裕司[2]、杉山 真言[2]、篠原 有香[2]、浦島 匡[3]、吹谷 智[4]、横田 篤[4]、岡田 信彦[1]、向井 孝夫[2] ([1]北里大・薬、[2]北里大・獣医、[3]帯広畜産大・畜産衛生、[4]北大院・農)

○Keita NISHIYAMA[1], Yuji YAMAMOTO[2], Makoto SUGIYAMA[2], Yuka SHINOHARA[2], Tadasu URASHIMA[3], Satoru FUKIYA[4], Atsushi YOKOTA[4], Nobuhiko OKADA[1], Takao MUKAI[2] ([1]Kitasato Univ., Sch. of Pharm., [2]Kitasato Univ., Sch. of Vet. Med., [3]Obihiro Univ., [4]Hokkaido Univ.)

*Bifidobacterium* 属細菌（ビフィズス菌）は，乳児から成人の大腸に棲息する嫌気性細菌であり，乳児では腸内細菌叢の 90%以上を占める。ビフィズス菌の宿主腸管における生存戦略として，腸粘膜への付着性と糖の資化性が重要な鍵を握っていると考えられているが，その分子機構は不明な点が多い。本研究では，*Bifidobacterium bifidum* ATCC 15696 の細胞外提示型のシアリダーゼ（SiaBb2）に着目し，付着因子と栄養獲得因子の両面からその役割について解析することで，*B. bifidum* の SiaBb2 を介した宿主腸管における定着機構の解明を目的とする。

*B. bifidum* の *siaBb2* 変異株を作製し，ヒトミルクオリゴ糖（HMO）を糖源として生育試験を行ったところ，野生株と比較し *siaBb2* 変異株の生育が低下した。また，シアリルラクトースや酸性ムチン糖鎖を糖源とした場合，その差がより顕著に認められた。さらに，腸上皮細胞への *B. bifidum* の付着性を検討したところ，*siaBb2* 変異株において有意（$p<0.01$）に低下した。これらの結果から，SiaBb2 が HMO やムチンに含まれる難分解性のシアリル化糖鎖を切断することで効率的に資化できること，さらに SiaBb2 が付着因子として機能すると考えられた。

次に，SiaBb2 の結合特性を理解するため，大腸菌を宿主として発現・精製した SiaBb2 組み換えタンパク質（His-SiaBb2）を用いて相互作用解析を行った。His-SiaBb2 は，ムチンに対して濃度依存的な結合性を示したが，SiaBb2 の中央に保存される Neuraminidase domain を欠損すると顕著に結合が低下した。興味深いことに，酵素活性阻害剤の添加は His-SiaBb2 の結合性に殆ど影響しないことから，1）Neuraminidase domain が結合に関与すること， 2）酵素活性は結合に必須ではなく糖鎖の切断と結合は異なる過程で生じると考えられた。そこで，糖鎖アレイを用いて Neuraminidase domain の結合エピトープ解析を行ったところ，6'-シアリルガラクトースに特異的に結合することに加え，A 抗原糖鎖に対しても結合性を示す興味深い性質をもつことを見出した。

以上の結果は，*B. bifidum* の SiaBb2 が腸管付着性と栄養獲得というビフィズス菌の生存に重要な役割を担う二機能性のタンパク質であることを示しており，ビフィズス菌の腸内環境における新たな生存戦略の存在を示すものと考えられる。

*Bifidobacterium bifidum*, colonization, sialidase

発表責任者：西山啓太（nishiyamak@pharm.kitasato-u.ac.jp）

講演番号：3C18p06
講演日時：3 月 19 日 15:25～ C 校舎 18 会場

*Paenibacillus sp.* FPU-37 株における 180-kDa 糖タンパク質遺伝子のクローニングと発現
Cloning and expression of a 180-kDa glycoprotein gene of *Paenibacillus sp.* FPU-37
○吉見 僚太[1]、藤井 豊[2]、田端 和仁[3]、野地 博行[3]、木元 久[1] ([1]福井県大院・生物資源、[2]福井大・医、[3]東大院・工)
○Ryota YOSHIMI[1], Yutaka FUJII[2], Kazuhito TABATA[3], Hiroyuki NOJI[3], Hisashi KIMOTO[1] ([1]Fukui Pref. Univ., [2]Fukui Univ., [3]Tokyo Univ.)

【背景・目的】
*Paenibacillus* 属の新種細菌である FPU-37 株は、優れた澱粉分解能力を指標として 2013 年に福井県内の土壌から分離された。その後、植物に対する生長促進効果や強力な抗真菌活性を有していることが明らかとなり、土壌改良材やバイオ農薬などへの応用が期待される。FPU-37 株はアミラーゼやグルカナーゼなどの糖質分解酵素を含む種々のタンパク質を培地中に分泌するが、その組成は添加する炭素源により大きく異なる。大変興味深いことに、澱粉の添加により約 180 kDa のタンパク質が大量に発現することを発見した。本研究の目的は、本タンパク質の機能を明らかにすることである。
【方法・結果】
FPU-37 株のゲノム情報は、次世代シーケンサにより解析した。180 kDa タンパク質は、その N 末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサにより解析し、得られたアミノ酸配列情報（ASNYQVLNTP）を利用してゲノム上の遺伝子を同定した。本遺伝子は、2,403 塩基対からなる ORF で、801 アミノ酸残基、60 アミノ酸残基のシグナルペプチドから構成されていた。しかしながら、シグナルペプチドが切断された成熟タンパク質の分子量は 78 kDa と算出され、SDS-PAGE による 180 kDa とは大きく異なっていた。また、プロテインシーケンスにより、180 kDa のタンパク質は高純度であることも確認されたが、そのバンドはスメア状であった。これらの結果から、180 kDa のタンパク質は、78 kDa のタンパク質として転写・翻訳後に糖鎖修飾された糖タンパク質ではないかと推測した。そこで、糖鎖の検出を行ったところ、予想通り 180 kDa タンパク質は糖タンパク質（GP180）であった。その後、GP180 特異的ペプチド抗体を用いたウエスタンブロットにより、GP180 は細胞画分に存在していることがわかった。また、蛍光抗体染色した FPU-37 株の共焦点レーザー顕微鏡による観察では、GP が菌体表層に局在していることが確認された。以上の結果から、GP は細胞表層に存在する糖タンパク質であることがわかった。基本的にバクテリアのタンパク質は糖鎖修飾されないが、例外として細胞の最外層（S 層）に存在するタンパク質は糖タンパク質であることが知られている。
現在、GP180 を液体クロマトグラフィーにより高純度精製し、その構造を解析しているところである。また、FPU-37 株における遺伝子操作系を構築し、セルフクローニングによる GP180 の大量発現も試みている。

glycoprotein, electroporation, Paenibacillus

発表責任者：吉見　僚太（s1573012@g.fpu.ac.jp）

講演番号：3C18p07
講演日時：3 月 19 日 15:40～ C 校舎 18 会場

枯草菌糖脂質合成酵素遺伝子 *ugtP* の発現制御解析
Analysis of regulation mechanism of glucolipid synthease gene *ugtP* in *Bacillus subtilis*
○松岡 聡、竹本 愛奈、関 貴洋、松本 幸次、朝井 計、原 弘志 (埼玉大理工研)
○Satoshi MATSUOKA, Aina TAKEMOTO, Takahiro SEKI, Kouji MATSUMOTO, Kei ASAI, Hiroshi HARA (Saitama Univ.)

枯草菌における糖脂質合成酵素 UgtP は、ジアシルグリセロールに UDP-グルコースを用いてグルコースを段階的に転移するグルコシルトランスフェラーゼである。UgtP によって合成される糖脂質であるモノグルコシルジアシルグリセロール(MGlcDG)、ジグルコシルジアシルグリセロール(DGlcDG)、トリグルコシルジアシルグリセロール(TGlcDG)は細胞膜の約 10%を占める。*ugtP* 破壊株は、細胞が太く短くなり、ECF シグマ因子(SigM, SigV, SigX)の活性化が見られた(Matsuoka *et al.*, 2011)。*ugtP* を破壊することにより、細胞に様々な影響が見られることから、糖脂質は枯草菌内で重要な役割をしていると示唆される。本研究では、未解明の枯草菌 *ugtP* の発現制御を明らかにすることを目的とした。*lacZ*転写融合を用いて *ugtP*プロモーター活性を調べたところ、*ugtP*は自身のプロモーターの他、上流の *metA* とオペロンを形成していることが分かった。また、このオペロンの転写は *ugtP* 破壊で上昇した。*metA* は SigM レギュロンである(Eiamphungporn & Helmann ,2008)ため、*ugtP* 破壊株における ECF シグマ因子の活性化による影響と考えられた。そこで *sigM,*破壊を導入したところ *metA* プロモーター活性は低くなったことから、*ugtP* 破壊によるプロモーター活性の上昇は SigM の影響であることが示唆された。一方、SigM 活性化条件である塩ストレス環境下において、糖脂質組成を調べたところ、MGlcDG 量は減少し、DGlcDG・TGlcDG 量は増加した。塩ストレスにより UgtP 酵素活性が変化し、MGlcDG 量が減少、その結果 *sigM* の活性化が引き起こされたと考えられる。以上から、枯草菌 *ugtP* の発現は糖脂質量の変化による ECF シグマ因子の活性化を介したフィードバック制御を受けていると示唆された。

glucolipid, ECF sigma factor, *Bacillus subtilis*

発表責任者：松岡　聡（matsuoka@mail.saitama-u.ac.jp）

講演番号：3C18p08
講演日時：3 月 19 日 15:55～ C 校舎 18 会場

*rsiV*変異株における枯草菌ファージφ29 の増殖阻害
Characterization of the *rsiV* mutations which affect the growth of subtilis phageφ29
○木寺 夏穂[1]、小田嶋 拓也[1]、刀禰 高広[1]、竹内 有[1]、兼崎 友[2]、吉川 博文[3]、朝井 計[4]、牧野 修[1] ([1]上智大・理工、[2]東農大・NGRC、[3]東農大・バイオ、[4]埼玉大・理工学研究科・分子生物学)
○Kaho KIDERA[1], Takuya ODAJIMA[1], Takahiro TONE[1], Ari TAKEUCHI[1], Yu KANESAKI[2], Hirofumi Yoshikawa[3], Kei ASAI[4], Osamu MAKINO[1] ([1]Fac. of Sci and Tec., Sophia Univ., [2]NGRC, Tokyo Univ. of Agric., [3]Dept. of Bios., Tokyo Univ. of Agric., [4]Crs. of Mol. Biol., Dept. of Sci. and Tec., Saitama Univ.)

枯草菌ファージφ29 のゲノムは約 20 kb と比較的小さいことからファージの効率的な増殖のためには様々な宿主因子が関与していると考えられるが、そのような因子は *mreB* 遺伝子や *rpo*A 遺伝子など数えるほどしか報告がない。本研究では、φ29 の増殖を抑制する枯草菌変異株の解析によりφ29 の増殖に関わる新たな宿主因子を同定することを目指した。自然突然変異により単離した変異株 78 株のうち 5 株の全ゲノム配列を決定して解析を進めたところ、*rsiV* 遺伝子に変異を持つ二つの変異株が得られた。それらはそれぞれ 4 塩基欠損株と開始コドンにおける 1 塩基置換株であった。これらの変異株において一段増殖実験や、リアルタイム PCR を行うことでφ29 の増殖阻害を定量的に観察したところ、親株と比較して著しく増殖効率が下がることが分かった。*rsiV* 遺伝子産物はリゾチームをシグナルとする環境応答性 ECF(extracytoplasmic function)型シグマ因子・SigV の抗シグマ因子である。膜に存在し、自身がリゾチームを検知した後にプロテアーゼによる分解を受けて SigV の抑制を解くことが報告されている。よって、φ29 の増殖阻害に *rsiV* または *sigV* が関わっている可能性が示唆された。しかし、*rsiV*、*sigV* それぞれと、*rsiV-sigV* オペロンのマーカーフリー欠失株において一段増殖実験を行ったところ、親株と同等の増殖が見られた。このことからφ29 の増殖阻害は *rsiV*、*sigV* 以外の因子が関与している可能性が考えられた。自然突然変異法で単離した *rsiV*変異株は親株由来の 4 つの遺伝子（*ybdO*, *ybaF*, *yddM*, *uvrX*）に変異を持つことが全ゲノム解析により既にわかっているため、それらの遺伝子と *rsiV* 遺伝子が相互作用することでφ29 の増殖阻害をもたらした可能性を視野に入れて検討している。

日本遺伝学会　第 88 回大会 2016 年 9 月「*rsiV*変異株における枯草菌ファージφ29 の増殖阻害」木寺他、
ファージ・環境ウイルス研究会　合同シンポジウム　2016 年 10 月「*rsiV*変異株における枯草菌ファージφ29 の増殖阻害」木寺他、第 39 回
日本分子生物学会年会 2016 年 12 月「*rsiV*変異株における枯草菌ファージφ29 の増殖阻害」木寺他　参照

*B.subtilis*, *rsiV*, SigV

講演番号：3C18p09
講演日時：3 月 19 日 16:10～ C 校舎 18 会場

枯草菌 $F_oF_1$ ATP 合成酵素活性調節の生理的意義の解明
The regulatory C-terminal region of the epsilon subunit in $F_oF_1$ ATP synthase is important for metabolic switching of *Bacillus subtilis*.
○赤沼 元気[1]、澤田 真帆[1]、多賀名 智明[1]、島田 友裕[2]、田中 寛[2]、大坂 夏木[3]、吉川 博文[3]、河村 富士夫[1]、山田 康之[1] ([1]立教大・理、[2]東工大・科学技術、[3]東農大・応生科)
○ Genki AKANUMA[1], Maho SAWADA[1], Tomoaki TAGANA[1], Tomohiro SHIMADA[2], Kan TANAKA[2], Natsuki OHSAKA[3], Hirofumi YOSHIKAWA[3], Fujio KAWAMURA[1], Yasuyuki YAMADA[1] ([1]Rikkyo Univ., [2]Tokyo Inst. of Tech., [3]Tokyo Univ. of Agric.)

【研究の背景・目的】$F_oF_1$ ATP 合成酵素は $H^+$の電気化学ポテンシャル差を利用して ATP を合成する一方で、ATP の加水分解によって $H^+$を輸送し、$H^+$の電気化学ポテンシャル差を維持する役割も果たす。これら逆向きの反応は厳密に制御される必要があると考えられる。枯草菌 $F_oF_1$ ATP 合成酵素においては、強固な ADP 阻害による ATPase 活性抑制と、εサブユニットの C 末端ドメインによる ADP 阻害軽減機構が存在する。εサブユニットによる活性調節は大腸菌や好熱菌でも確認されており、精製 $F_1$ 複合体を用いた生化学的な解析によってその機構が明らかにされてきた。しかしながら、εサブユニットによる $F_oF_1$ ATP 合成酵素の活性調節にどのような生理的意義が存在するのかは不明である。そこで我々は、活性調節に必須なεサブユニットの C 末端ドメインを欠損させた枯草菌変異株（$atpC^{\Delta C}$）を作製し、その表現型からこの活性調節の意義を推察することを試みた。
【結果と考察】$atpC^{\Delta C}$ 変異株では細胞内 ATP 濃度の上昇と、コハク酸を炭素源とした培地における生育遅延が観察されたことから、εサブユニットの C 末端欠損変異は ATP の分解・合成の双方に影響を及ぼすことが示唆された。しかしその他に顕著な表現型は観察されず、活性調節の生理的意義について考察するには不十分であると考えた。そこで、εサブユニット C 末端欠損変異を rRNA オペロンのコピー数を制限した株（$rrnBD^+$）に導入したところ、対数増殖期後期において生育の停滞が観察された。この異常が起こるメカニズムを解明することが、εサブユニットによる活性調節の生理的意義の理解に繋がると考え、生育停滞期における細胞内外の変化を探索した。その結果、LB 培地中のグルコース枯渇が生育停滞の引き金になっていることが判明した。$rrnBD^+$ $atpC^{\Delta C}$ 株ではグルコース枯渇による呼吸停止の冗長化と、膜電位の低下が観察された。これらは恐らく、$F_oF_1$ ATP 合成酵素の ATPase 活性低下とそれに伴う $H^+$輸送能低下が原因であると予想される。また、$rrnBD^+$ $atpC^{\Delta C}$ 株では生育停滞期における 70S リボソーム量の低下が確認されており、細胞内翻訳活性の低下も生育停滞の一因であると考えられる。以上の結果などから、εサブユニットによる活性調節はグルコースからの代謝の切り替えに重要な役割を果たしているのではないかと考えている。

$F_oF_1$ ATP synthase, Bacillus subtilis, rrn

発表責任者：赤沼元気（akanuma@rikkyo.ac.jp）

講演番号：3C18p10
講演日時：3 月 19 日 16:25～ C 校舎 18 会場

# $Mg^{2+}$ による多様なリボソームタンパク質機能の相補

# $Mg^{2+}$ is able to suppress the defects caused by lack of ribosomal proteins

○山崎 晃太朗、赤沼 元気、矢岸 勇真、河村 富士夫、山田 康之（立教大理）
○ Kotaro YAMAZAKI, Genki AKANUMA, Yuma YAGISI, Hujio KAWAMURA, Yasuyuki YAMADA (Rikkyo Univ.)

【背景と目的】バクテリアのリボソームは rRNA とリボソームタンパク質によって構成される 70S の複合体であり、30S と 50S のサブユニットから形成される。枯草菌 50S リボソームを構成する L34 リボソームタンパク質の欠損株では、70S 複合体形成異常とそれに伴う生育遅延が観察されるが、細胞内 $Mg^{2+}$濃度の向上によってこれらの異常からの回復が観察される。L34 欠損によって不安定化したリボソームの構造が $Mg^{2+}$によって安定化されると仮定すると、L34 以外のリボソームタンパク質欠損の影響も、細胞内 $Mg^{2+}$濃度の向上によって抑制できることが予想される。そこで本研究では、枯草菌 L1、L23、L36、S6 の各リボソームタンパク質欠損株を用いて、$Mg^{2+}$によるリボソームタンパク質機能の相補効果を明らかにすることを目的とした。

【方法と結果、及び考察】それぞれのリボソームタンパク質欠損株に対し、$Mg^{2+}$の取り込みを担う *mgtE* を有するマルチコピープラスミドを導入し、$Mg^{2+}$の排出を担う *yhdP* を欠損させることで、細胞内 $Mg^{2+}$濃度の人為的な向上を試みた。各変異株の対数増殖期における菌体から $Mg^{2+}$量を解析し、生菌数と細胞のサイズを併せて測定することで、細胞内 $Mg^{2+}$濃度を算出した。その結果、各変異株において細胞内 $Mg^{2+}$濃度の向上が認められた。$Mg^{2+}$濃度向上による生育速度回復効果を LB 液体培地、37°C の条件で検証したところ、L1, L23 欠損株において生育速度の回復が観察された。また、ショ糖密度勾配超遠心法により 70S 複合体形成量を観察した結果、各変異株において差はあるものの、$Mg^{2+}$濃度向上による 70S 複合体形成能回復への一定の効果が認められた。一方、L1 欠損株では胞子形成異常（形成率は 0.01%以下）も観察されているが、細胞内 $Mg^{2+}$濃度向上により顕著な胞子形成能の回復が観察された。以上の結果は、恐らくリボソームの構造維持という点において、種々のリボソームタンパク質機能が $Mg^{2+}$によって相補可能であることを示唆している。

Bacillus subtilis, Ribosome, Magnesium

発表責任者：赤沼元気（akanuma@rikkyo.ac.jp）

講演番号：3C18p11
講演日時：3 月 19 日 16:50～ C 校舎 18 会場

# 大腸菌は L-アラニン排出輸送体 AlaE と新規排出輸送体 YtfF によって L-アラニンを排出する

# L-alanine is exported by the novel efflux pump YtfF and the L-alanine exporter AlaE in *Escherichia coli*

○勝部 哲、金 世怜、齊藤 康平、安藤 太助、磯貝 恵美子、米山 裕 (東北大農)
○Satoshi KATSUBE, Seryoung KIM, Kohei SAITO, Tasuke ANDO, Emiko ISOGAI, Hiroshi YONEYAMA (Tohoku Univ.)

【目的】

我々はこれまで L-アラニン(L-Ala)排出能を欠損した大腸菌変異株を分離することに成功し、この排出能を相補する遺伝子として 4 つの遺伝子を同定した。この中で 2 つの遺伝子(*ygaW*, *ytfF*)はこれまで全く報告例のない機能未知遺伝子であり、*ygaW* が主要な L-Ala 排出輸送体をコードすることを明らかとしこの新規遺伝子を *alaE* と命名した。一方、YtfF に関しては生理的基質が本当に L-Ala であるのか等、その生理的役割は依然不明である。そこで本研究では、YtfF の生理機能を明らかにするために、L-Ala アナログに対する YtfF の輸送活性と L-Ala 輸送能に及ぼすエネルギー阻害剤の影響を評価した。また、*ytfF* 遺伝子の発現に及ぼす各種 L-Ala アナログの影響を調べた。

【方法】

YtfF 過剰発現株および YtfF 欠損株から調整した反転膜小胞内への[$^3$H] L-Ala の蓄積量を測定し YtfF の輸送活性の指標とした。次いで、CCCP や DCCD 等のエネルギー阻害剤の YtfF 輸送活性に及ぼす影響を調べた。各種 L-Ala アナログの *ytfF* 遺伝子の発現に及ぼす影響を調べるために、RT-PCR およびβ-ガラクトシダーゼを用いたレポーターアッセイを行った。また、生菌における YtfF と AlaE の L-Ala 排出能の差異を評価するために、L-Ala 異化経路を欠損したアラニル-アラニン(Ala-Ala)高感受性株に *ytfF* あるいは *alaE* 遺伝子を導入した形質転換体の Ala-Ala に対する感受性を評価した。

【結果】

反転膜小胞内への各種 L-Ala アナログの蓄積を調べた結果、YtfF は L-Ala の他にβ-Ala を排出する輸送体であることが分かった。しかし、その輸送効率は L-Ala の方が高い傾向を示したことから L-Ala が YtfF の主要な基質であると考えられた。また、YtfF の小胞内への[$^3$H]L-Ala 蓄積は CCCP およびナイジェリシンで阻害されたことから、YtfF はプロトン濃度勾配を使って基質を輸送していることが示唆された。発現制御解析では、AlaE が L-Ala によって誘導がかかるのに対して、YtfF は L-Ala 及びβ-Ala のいずれを添加した条件下でも発現量に変化は見られなかった。このことから、YtfF は構成的な発現をしていることが分かった。さらに、AlaE 過剰発現株の Ala-Ala 感受性は YtfF 過剰発現株より低下していた。このことは、AlaE の Ala-Ala に由来する L-Ala の排出効率が YtfF のそれより高いことを意味しており、YtfF と AlaE は in vivo において異なる機能を持つ L-Ala 排出輸送体であることが示唆された。

*Escherichia coli*, L-Alanine, Efflux pump

講演番号：3C18p12
講演日時：3 月 19 日 17:05～ C 校舎 18 会場

# 大腸菌の L-アラニン排出輸送体 AlaE の構造と機能解析

Structural and functional analysis of L-alanine exporter AlaE in *Escherichia coli*

○伊原 航平、金 世怜、安藤 太助、磯貝 恵美子、米山 裕（東北大院農）
○Kohei IHARA, Seryoung KIM, Tasuke Ando, Emiko ISOGAI, Hiroshi YONEYAMA (Tohoku Univ.)

【目的】当研究室では、大腸菌における L-アラニン特異的な排出輸送体として、AlaE（以前は YgaW）を同定することに成功した。AlaE 欠損株は高濃度の L-アラニン存在下で生育が抑制されることから、AlaE は細胞内の L-アラニン濃度の恒常性を保つ安全バルブとして機能することが示唆されている。しかし、AlaE の基質排出メカニズムについては、そのホモログも含め全く解析が行われておらず、詳細な構造や機能は明らかになっていない。そこで、本研究では AlaE の構造と機能を解析するための第一歩として AlaE のオリゴマー構造についての解析を行った。
【方法】AlaE がオリゴマー構造を形成するかどうかを調べるため、タンパク質架橋試薬を用いたクロスリンク試験とプルダウンアッセイを行った。また、AlaE のオリゴマー構造形成を担う領域を特定するため、AlaE の第 4 膜貫通領域のアラニンスキャニング変異体を作製し、AlaE の活性およびオリゴマー形成能へ与える影響を評価した。
【結果と考察】AlaE は、149 のアミノ酸残基からなり、4 回の膜貫通領域をもつ、分子量が 17 kDa 程度の非常に小さい輸送体である。したがって、オリゴマーを形成して機能する可能性があると考えられる。AlaE がオリゴマーを形成するかどうかを評価するためクロスリンク試験を行った結果、AlaE の分子量のほぼ 2 倍量にあたる 30～33 kDa の位置に、クロスリンク産物のバンドが確認された。この結果から、AlaE はホモオリゴマー（ダイマー）を形成する可能性が考えられた。この仮説を検証するためプルダウンアッセイを行ったところ、AlaE の分子間同士での相互作用が認められた。これらの結果から AlaE は、ホモオリゴマーを形成して機能する輸送体であることが示唆された。
　続いて、AlaE のオリゴマー形成に関与する領域を探るため、第 4 膜貫通領域の機能解析を行った。AlaE の第 4 膜貫通領域には、オリゴマー形成や膜貫通ヘリックス同士の相互作用に重要な GxxxG モチーフが存在する。本研究では、このモチーフが、AlaE のオリゴマー形成に関与するかを明らかにするため、第 4 膜貫通領域のアラニンスキャニング変異体を作製し、その活性を評価した。その結果、GxxxG モチーフ周辺の 5 つのアミノ酸残基が機能に重要な役割を担うことが明らかとなった。次いで、プルダウンアッセイにより、アラニンスキャニング変異体のオリゴマー形成能を評価した結果、活性の低下が認められた変異体は、野生型とほぼ同等のオリゴマー形成能をもっていることが明らかとなった。これらの結果から、AlaE の第 4 膜貫通領域に存在する GxxxG モチーフは、オリゴマーの形成には関与しないが、これらのアミノ酸残基は AlaE の機能上重要であることが明らかとなった。

L-alanine exporter, AlaE, *Escherichia coli*

講演番号：3C18p13
講演日時：3 月 19 日 17:20～ C 校舎 18 会場

*Sphingobium* sp. TCM1 株における有機リン難燃剤分解代謝に関与するアルカリホスファターゼ遺伝子の同定
Identification of alkaline phosphatase genes for the utilization of an organophosphorus flame retardant in *Sphingobium* sp. strain TCM1
○高橋 祥司、片沼 拓士、阿部 勝正、解良 芳夫（長岡技科大・生物）
○Shouji TAKAHASHI, Hiroshi KATANUMA, Katsumasa ABE, Yoshio KERA (Nagaoka Univ. Tech.)

【背景・目的】含塩素有機リン酸トリエステルの一つであるリン酸トリス（2-クロロエチル）（TCEP）は主にプラスチックの難燃剤として広く利用されており，物理化学的に安定であり微生物分解を受け難いことから，河川や湖沼などの自然環境だけでなく水道水からも検出されている。TCEP は神経毒性や発がん性が指摘されていることから，ヒトを含む生態系への悪影響が懸念されている。我々は微生物による TCEP 分解除去技術を開発するために, TCEP 分解菌 *Sphingobium* sp.TCM1 株を単離した. TCM1 株において，TCEP はホスホトリエステラーゼ(PTE)，ホスホジエステラーゼ（PDE）およびホスホモノエステラーゼ(PME)による一連の酵素反応により分解代謝されると考えられており, PDE もしくは PME が分解代謝系の律速段階であることが示唆されている。そこで本研究では，TCM1 株による効率的な TCEP 分解代謝を達成するため，本菌株における PME の一種であるアルカリホスファターゼ（APase）の同定と TCEP 分解代謝への関与を解析した。
【方法・結果】】TCM1 株のドラフトゲノム配列において既知の APase に相同性を有する遺伝子を探索したところ，4 つの APase 相同遺伝子（CDS153691，CDS130194，CDS64595，CDS16155）を見出した。これら相同遺伝子はそれぞれ APase の PhoA ファミリー（CDS64595），PhoD ファミリー（CDS153691，CDS16155）および PhoK ファミリー（CDS130194）に系統分類されたことから，各遺伝子を *SbphoA*，*SbphoD1*，*SbphoD2*，*SbphoK* と名付けた。各遺伝子を *E. coli* で発現させ，粗抽出液の APase 活性を測定したところ，*SbphoA* と *SbphoK* 発現株において有意な APase 活性がみられ，特に *SbphoK* 発現株で高い活性が観察された。発現産物を SDS-PAGE により解析したところ，SbPhoK のみ可溶性画分に観察され，他の発現産物は不溶性画分に見られた。粗抽出液を用いて APase 活性に及ぼす 2 価金属イオンの添加効果を解析したところ，SbPhoK において $Mg^{2+}$添加により約 1.5 倍の活性増加が観察されたが，$Zn^{2+}$の添加により著しく減少した。一方 SbPhoA では，$Zn^{2+}$と $Ca^{2+}$添加によりそれぞれ約 7 倍と 2 倍の活性増加が観察された。各 APase 遺伝子破壊株を作成し，TCEP を唯一のリン源とした最少培地で生育を観察したところ, *SbphoD1* と *SbphoD2* 破壊株は野生株と同等の生育能を示したが，*SbphoA* と *SbphoK* 破壊株では生育能の低下が観察され，特に *SbphoK* 破壊株で著しい生育能の低下が観察された。また, *SbphoA*/*SbphoK* 二重破壊株では完全に生育能を失った。以上の結果から，TCM1 株において *SbphoA* と *SbphoK* が APase をコードしており TCEP の分解代謝に関与することが明らかとなった。

Alkaline phosphatase, Tris(2-chloroethyl) phosphate, *Sphingobium* sp.

発表責任者：高橋 祥司（shoutaka@vos.nagaokaut.ac.jp）

講演番号：3C18p14
講演日時：3 月 19 日 17:35～ C 校舎 18 会場

放線菌 *Streptomyces griseus* において形態分化に関与する遺伝子 *SGR3428* の機能解析
Functional analysis of *SGR3428* involved in morphological development in *Streptomyces griseus*
○戚 思聡、手塚 武揚、大西 康夫（東大院・農生科）
○Sicong QI, Takeaki TEZUKA, Yasuo OHNISHI (Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., Univ. of Tokyo)

【背景と目的】放線菌 *Streptomyces griseus* は栄養豊富な YMPD プレート上で培養すると形態分化が進行し、気中菌糸形成と胞子形成を行う一方、YMPD 液体培地で培養しても胞子形成は観察されない。そこで、形態分化に関わる新規な遺伝子を探索するため、RNA-Seq で *S. griseus* の YMPD 固体培地と YMPD 液体培地のトランスクリプトームを比べたところ、液体培地と比較して固体培地で培養した時に、転写産物量が 10 倍以上であり、かつ *Streptomyces* 属放線菌で高度に保存された機能未知の遺伝子が 21 個見出された。本研究では、これらの固体培養特異的に発現量が増大する遺伝子の機能解析を行った。
【方法と結果】21 個遺伝子を個々にゲノム上から欠失させた遺伝子破壊株を作製し、野生株と表現型を比較したところ、*SGR3428* 破壊株では形態分化能の低下が観察された。この表現型の変化は野生型の *SGR3428* 遺伝子を破壊株に導入することで回復したことから、*SGR3428* が YMPD プレート上での形態分化の正常な進行に必須の遺伝子であることが明らかになった。走査型電子顕微鏡で野生株、破壊株と相補株のコロニーを観察したところ、破壊株ではコロニー中心部で形態分化の遅延が見られ、コロニー辺縁部では気中菌糸の形成が顕著に抑制されていた。また、BM 固体培地で培養した場合、YMPD 固体培地と同様に破壊株で形態分化の低下が見られた一方、R2YE 固体培地では破壊株の形態分化が野生株よりも促進されていた。RT-qPCR による転写解析の結果、*SGR3428* の転写産物量は気中菌糸の形成が開始される時期に最も多いことが判明した。また、ヒスチジンタグを付加した SGR3428 タンパク質を破壊株で発現させたところ、形態分化能の低下が回復したことから、この株で抗 His-tag 抗体によるウエスタン解析を行ったところ、SGR3428 タンパク質はやはり気中菌糸の形成期に強く検出された。一方、野生株と破壊株でストレプトマイシン生産量に違いは見られなかった。また、Gel-shift Assay の結果、*SGR3428* は *S. griseus* の形態分化に重要な役割を果たす転写活性化因子 AdpA によって直接制御されていないことが示唆された。*In silico* 解析の結果、他の *Streptomyces* 属放線菌のゲノムにも *SGR3428* とその周辺領域の遺伝子が保存されている一方、*Streptomyces* 属以外の放線菌及び放線菌以外の生物のゲノム上には、*SGR3428* のオルソログが存在していないため、*SGR3428* は *Streptomyces* 属に特異的な機能を持つ遺伝子であると考えられた。

*Streptomyces griseus*, morphological development, functional analysis

講演番号：3C18p15
講演日時：3 月 19 日 17:50～ C 校舎 18 会場

# ビフェニル資化性ゲノミックアイランド ICEbph の切り出し制御の分子機構の解析

# Analysis of molecular mechanism for the regulation of excision of a biphenyl-utilizing genomic island, ICEbph

○荻野 千紘、前田 理久（明治大学大学院農学研究科）
○Chihiro OGINO, Michihisa MAEDA (Meiji Univ.)

バクテリアは環境に適応するために外来からの遺伝子の獲得を頻繁に行っている。遺伝子の獲得の中でも、水平伝達は同世代で遺伝子の受け渡しが起こるため、有利な形質を素早く獲得することが可能であり、バクテリアの進化に関わっている。水平伝達によってバクテリア間を移動する領域は、宿主クロモソームと比較して GC 含量やコドンの使用頻度が異なることから区別することができ、ゲノミックアイランドと呼ばれている。さらに、宿主クロモソームに組み込まれた後でも可動性を保持している領域は Integrative and conjugative element (ICE)と呼ばれている。これまでに、様々なバクテリアにおいて、化合物の分解遺伝子群、薬剤耐性遺伝子群、病原性に関わる遺伝子群、共生遺伝子群などをコードしている ICE が確認されている。一般的に ICE は、クロモソームから切り出され環状中間体を形成し、環状中間体が菌同士の接触によって受容株に移動し、クロモソームに組込まれる機構で伝達すると考えられている。この ICE の切り出しと組込みには組換え酵素であるインテグラーゼが必要であることが明らかとなっている。さらに、いくつかの ICE では、インテグラーゼの切り出し、組込みの方向性を決定する Recombination directly factor(RDF)の存在が確認されている。

*Alcaligenes denitrificans* A41 株(以下 A41 株)はβ-プロテオバクテリア綱に属するグラム陰性菌で、PCB/ビフェニル(*bph*)分解遺伝子群を保持しているためビフェニルの資化が可能である。PCB/ビフェニル分解遺伝子群は 53 kb の ICE 上(ICE*bph*)に存在し、その他にプラスミドの分配や接合伝達に関与する遺伝子群などもコードされている上述のように水平伝達は ICE の切り出しから開始される。切り出しは、ICE*bph* の左末端に存在するインテグラーゼ(*intA41*)によって行われるが、そのきっかけがどのように制御されているかは未だ明らかにされていない。これまでの研究で、*intA41* 遺伝子の転写制御に影響を与える遺伝子として、ICE*bph* 上に存在する *bphR* および *orf50* が同定されている。われわれは、ICE*bph* の切り出し制御に関与する遺伝子が他にないか、あるいは相互の詳細な分子機構について研究を行っている。また、*orf50* は配列から RDF であることが推測されている。今回は、*intA41*, *orf50*, *bphR* に着目し、これらの遺伝子が関与した制御機構について、分子間相互作用を中心に報告する。

現在までに、*bphR* の発現パターン、Orf50 と DNA の相互作用の解析が進み、さらに、IntA41 のインビトロでの機能解析、IntA41-Orf50 相互作用解析、BphR インデューサー探索に着手している。

genomic island, biphenyl, excision

発表責任者：荻野千紘（chi_ogi50107@yahoo.co.jp）

講演番号：3C18p16
講演日時：3 月 19 日 18:05～ C 校舎 18 会場

グラム陰性細菌 *Paracoccus denitrificans* の付着因子の解析
Biofilm formation by a Gram-negative bacterium *Paracoccus denitrificans*
○吉田 圭太朗、豊福 雅典、尾花 望、野村 暢彦（筑波大院・生命環境）
○Keitaro Yoshida, Masanori Toyofuku, Nozomu Obana, Nobuhiko Nomura (Univ. Tsukuba)

【背景と目的】多くの細菌は環境中で、固体表面に付着してバイオフィルム(BF)と呼ばれる集団を形成して生息する。バイオフィルムの形成は浮遊状態の菌体が固体表面へ付着することで始まり、細菌の付着はこれらのライフスタイルの分岐点となるプロセスである。細菌の付着には菌体と固体表面の接触が鍵であり、運動性を有する細菌は積極的に固体表面と接触して付着する。一方、非運動性グラム陰性細菌の BF 形成機構についての詳細な知見は乏しい。非運動性細菌は自ら移動することはできないが、周囲の水の流れや沈降によって受動的に固体表面と接触して付着し、BF を形成すると考えられている。興味深いことに、非運動性グラム陰性細菌 *Paracoccus denitrificans* は、水の流れが無い静置培養条件下において固体表面にバイオフィルムを形成できる。本研究では *P. denitrificans* の BF 形成機構を明らかにすることを目的とした。
【方法と結果】*P. denitrificans* はマイクロタイタープレートの壁面に気液界面で付着してバイオフィルムを形成した。気液界面は鞭毛を駆動力とする swimming motility を有する細菌が BF を形成することが知られるが、*P. denitrificans* は swimming motility を示さなかった。さらに、*P. denitrificans* は鞭毛の遺伝子を部分的に有するが、鞭毛の遺伝子を欠損させた株においても野生株と同様に BF を形成した。これらの結果から、*P. denitrificans* は非運動性であるにも関わらず流れが無い条件下において気液界面で固体表面に付着して BF を形成できることが示唆された。*P. denitrificans* における BF 形成因子を探索するため、トランスポゾン(Tn)ミュータントライブラリーを構築し、BF を形成できない Tn ミュータントをスクリーニングした。その結果、4416 株の Tn ミュータント中、27 株の BF 非形成変異株を得た。この内、11 株においては同一のゲノム領域に Tn が挿入されており、この領域が BF 形成に必要であることが示唆された。これらのミュータントの菌体表面の疎水性を測定した結果、野生株より疎水性が低下していた。これらの結果より、非運動性細菌 *P. denitirificans* は菌体表面の疎水性因子によって、流れの無い環境下においても固体表面へ付着し、BF を形成できると考えられた。本発表ではトランスポゾン挿入箇所の解析結果と合わせて発表を行う。

biofilm, motility, *Paracoccus denitrificans*

発表責任者：野村暢彦（nomura.nobuhiko.ge@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3C19a01
講演日時：3 月 19 日 09:20～ C 校舎 19 会場

# 固体表面への付着現象を利用した環境微生物の分離技術の開発

Development of isolation methodology of environmental microbe using adhesion to solid surface

○羽鳥 伸太郎、大西 章博、藤本 尚志、鈴木 昌治（東農大）
○Shintaro HATORI, Akihiro OHNISHI, Naoshi FUJIMOTO, Masaharu SUZUKI (Tokyo Univ. Agric.)

【背景と目的】自然界には培養困難な微生物が数多く存在するため、複合微生物系の生態解析には培養法に依存しない遺伝子解析技術が用いられている。クローニング法や PCR-DGGE 法などは主に生態系の多数派グループの理解が可能であるが、近年発展してきた NGS（次世代シーケンサー）では存在率が 0.1%を下回る少数派グループの検出も可能になりつつある。しかしながら、これらの技術では生きた細胞の獲得は不可能である。本研究では、微生物細胞が固体表面へ物理化学的に付着する現象を利用して、少数派グループを分離する新たな技術開発を試みる。これまでの検討により、複合微生物系の微生物細胞のうちガラス表面に付着する細胞は、その後の簡単な洗浄により滑落する細胞と、ガラス表面に付着し続ける細胞があることが明らかとなった。また、この過程で試料中の 0.0013%程度の少数派の生きた微生物細胞が獲得できたことについても報告した。今回は土壌を本実験に供した結果について報告する。

【実験材料と方法】供試培地には肉エキス培地を用いた。植種源には土壌を用いた。土壌 5.0g をリン酸緩衝液 50ml で懸濁後、7μm フィルターを用いてろ過を行った。ろ液を遠心分離により集菌して供試培地で再懸濁したものを供試試料とした。25ml 容試験管に供試培地を 9ml 加えてオートクレーブ滅菌して希釈培養用培地として用いた。供試試料を希釈培養用培地で段階的に希釈して 37℃で培養した。これを供試培地で生育可能な生菌数とした。供試試料に滅菌したガラス板（25×25×1mm）を 3 分間浸漬させ、その後リン酸緩衝液 50ml に浸漬し、ガラス表面を洗浄して微生物細胞を滑落させた。この洗浄作業は合計 10 回行った。これらの洗浄液の全量及び洗浄後のガラス板を供試培地に加えて培養を行った。菌体が増殖した培養物は PCR-DGGE 法により解析した。

【結果及び考察】微生物の増殖が確認できた培養物のうち植種の希釈率が最も高い培養物は $10^{6}$ 希釈であったことから、試料土壌 1g 中における生菌数は $10^{7}$cells/g であることが示された。この培養物は植種に含まれる優占菌種で構成されるものと考えられた。また、ガラス板洗浄後の洗浄液を培養した結果、洗浄 5 回目までで微生物の増殖が確認できた。また、洗浄後のガラス板（G）の培養物でも同様に微生物の増殖が確認された。PCR-DGGE による菌相解析の結果から、洗浄過程で滑落する細胞の培養物と試料の単純な希釈で得られる培養物には明確な差があることが示された。これらのことから、本手法では微生物細胞がガラス板表面に接着する過程や、洗浄によりガラス板表面から滑落する過程において、試料中における微生物細胞の濃度とは別に微生物細胞のガラス板表面への脱着に偏りが生じるものと考えられた。

microflora, isolation methodology, microbial attachment

講演番号：3C19a02
講演日時：3 月 19 日 09:35～ C 校舎 19 会場

# 共培養法による環境試料からのセルロース分解菌の集積

# Enrichment of the cellulose degrading microflora from environmental samples by co-culture method.

○北村 俊貴、大西 章博、藤本 尚志、鈴木 昌治（東農大）
○Toshiki KITAMURA, Akihiro OHNISHI, Naoshi FUJIMOTO, Masaharu SUZUKI (Tokyo Univ. Agric)

【背景と目的】近年、分子生物学的技術の発達により培養操作を経ずに微生物が検出できるようになり、環境中の微生物生態系には培養困難もしくは培養が不可能な微生物が多数含まれることがわかってきた。本研究グループでは Co-culture 法と名付けた共培養による新たな未培養微生物の獲得技術を提案した[1)]。Co-culture 法では集積培養過程に特定の微生物（Bait と呼称する）を共存させることで、優占化する微生物相に変化を与える。その後、希釈培養法による分離段階において Bait だけが排除される条件を与えることで、集積された微生物相だけを効率的に分離することができる。本研究では、Co-culture 法を適応したセルロース分解微生物の探索を試みる。今回は２６種類の環境試料を植種源として用いた結果を報告する。まず、各試料から微生物細胞を浸出し、Co-culture 法と通常の集積培養法にてセルロース分解菌の集積を試みた。

【実験材料と方法】*Aeromonas salmonicida* を Bait として用いた。植種源には、メタン発酵槽より採取した嫌気性グラニュール、活性汚泥、学内より採取した土壌２０種、木の木片４種の計２６種類の環境試料を用いた。各環境試料 3g を 0.85%生理食塩水 27ml で懸濁し、5 分間撹拌して菌体剥離懸濁液を得た。125ml 容バイアルに D58 改変培地を 50ml 充填し、濾紙（10×50 ㎜）を加え、気相部を窒素置換して密栓後滅菌した。Bait を菌体濃度 $OD_{660}$≒1.0 となるように添加した系（以下、Co-culture）と添加していない系（以下、Control）を用意し、各菌体剥離懸濁液を 1.0ml 接種し、37℃で静置培養した。濾紙分解の有無からセルロース分解菌の集積を判定し、セルロース分解が確認された培養物は新たな培地に再度接種して培養を繰り返した。微生物相の解析は PCR-DGGE 法により行った。

【結果及び考察】２６種類の環境試料を植種とした実験において、Control では１０試料（約３８％）、Co-culture では１５試料（約５８％）で濾紙分解が確認された。また、濾紙分解が確認されるまでの培養期間の平均は Control で約１６日、Co-culture で約１１日であった。菌相解析の結果、*Clostridium hungatei* や *Clostridium polysaccharolyticum*、*Clostridium termitidis* 等のセルロース分解能を有する微生物の存在が確認された。このように、Co-culture 法では通常の集積培養法と比べて高い確率でセルロース分解菌を集積できることが示された。今後は主要菌種の純粋分離を試みる。

1】　井上　拓　日本生物工学会 2012 年度大会講演要旨集

Co-culture, cellulose, Aeromonas salmonicida

講演番号：3C19a03
講演日時：3 月 19 日 09:50～ C 校舎 19 会場

Construction of a microbial co-culture useful for ammonification and nitrification
○Sakuntala SAIJAI[1], Akinori ANDO[1,2], Wakako OKADA[1], Kenji MIYAMOTO[3], Yasuo KATO[4], Makoto SHINOHARA[5], Jun OGAWA[1,2] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Res. Unit Physiol. Chem. Kyoto Univ., [3]Dept. Biosci. Inform., Keio Univ., [4]Biotech. Res. Cent., Toyama Pref., [5]NARO)

[Background] In soil, ammonification and nitrification of organic nitrogen were naturally occurred, even though most of autotrophic nitrifying bacteria were unable to utilize organic nitrogen compounds. The interaction between heterotrophs and these autotrophs will be necessary for controlling the mineralization of organic nitrogen compounds. However, the complexity of soil makes it difficult to study nitrifying microbial communities. A simple model system is required to investigate these microbial communities. The aim of this study is to construct a simple co-culture using only three strains, a heterotrophic bacterium, an ammonia-oxidizing bacterium, and a nitrite-oxidizing bacterium, as a microbial interaction model for ammonification and nitrification.

[Method and result] A microbial co-culture which consisted of identified heterotrophic bacteria, *Nitrosomonas europaea* NBRC 14298 and *Nitrobacter winogradskyi* NBRC 14297 was constructed for ammonification and nitrification of organic nitrogen under aerobic condition. Twelve strains of heterotrophic bacteria without denitrification activity were selected as candidates for the co-cultivation.

The co-culture of *Bacillus badius* NBRC 15713 with nitrifying bacteria performed ammonification and nitrification effectively under following conditions; pH range 7-10, various kind of organic nitrogen (derived from fish, soybean, and milk), C/N ratios range 10 to 50, and organic compound concentration below 0.2%. When the co-culture was performed in the medium containing Polypepton NF (Total-N 120 mg, C/N ratio 10) at 28 ºC, the nitrification was completed at day 11 of cultivation. The population transition of nitrifying bacteria analyzed by RT-PCR showed clear relation to the concentration transition of nitrite and nitrate ions. The co-culture system could be valuable as an artificial ammonification and nitrification model.

nitrification, nitrifying bacteria, co-culture

講演番号：3C19a04
講演日時：3 月 19 日 10:05～ C 校舎 19 会場

必要最小限の土壌微生物（エレメンタル土壌微生物）の有機物耐性
Organic tolerance of elemental soil microorganisms with nitrification ability
○篠原 信[1]、高田 惟名[2]、河邑 ちひろ[1]、藤原 和樹[1]、安藤 晃規[3]、宮本 憲二[4]、加藤 康夫[5]、小川 順[3]、高野 雅夫[2] ([1]農研機構、[2]名大院・環境、[3]京大院農・応用生命、[4]慶大・理工、[5]富山県立大工)
○Makoto SHINOHARA[1], Yuina Takada[2], Chihiro Kawamura[1], Kazuki Fujiwara[1], Akinori Ando[3], Kenji Miyamoto[4], Yasuo Kato[5], Jun Ogawa[3], Masao Takano[2] ([1]NARO, [2]Nagoya Univ., [3]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [4]Dept. Biosci. Inform., Keio Univ., [5]Biotech. Res. Cent., Toyama Pref. Univ.)

[背景・目的]
「有機物を分解し植物に好適な無機養分を供給する」機能を土壌機能と定義すると、これは土壌だけの特異機能である。土壌以外の媒体、たとえば水や人工樹脂、鉱物などに土壌機能を付与することはこれまで不可能で、土壌以外の媒体に有機物を施用して栽培することはできなかった。有機質肥料活用型養液栽培はこれを可能にした技術である。水や人工樹脂、各種鉱物に土壌機能を付与し、いわば人工的に土壌を創出することで、有機物を無機養分に変換、植物を育成することが可能である。ただし微生物源として自然土壌を使用するため､微生物種は 1 万種類を超え､科学的な解析が難しかった。従って土壌機能の基本反応であるアンモニア化成と硝酸化成をごくわずかな菌種で再現できれば、土壌のメカニズム解明に画期となるモデル系となる可能性がある。しかし硝酸化成を担う硝化菌は、有機成分の曝露により容易に失活、あるいは死滅する。そこで本研究では、アンモニア化成を担う菌、硝酸化成を担うアンモニア酸化菌、亜硝酸酸化菌の 3 菌株でアンモニア化成、硝酸化成を進め、有機成分の曝露への耐性を同時に付与する研究を行う。
[方法・結果]
アンモニア化成を進める微生物を探索するため、BTB を含む鰹煮汁寒天培地を作成、青発色するコロニーから微生物を単離培養した。このうち、アンモニア生成能の高い微生物をアンモニア化成菌候補として 4 菌株分離した。16S rDNA 配列を調べたところ、いずれも *Delftia* 属細菌であった。これらを鰹煮汁培地でアンモニア酸化菌、亜硝酸酸化菌と共培養したところ、いずれの組み合わせでも硝酸の生成を認めた。そこでこれを前培養液として新たに鰹煮汁培地に加えたところ、アンモニア化成で反応が停止し、硝酸の生成が認められなかった。これは、アンモニア化成菌が有機成分の曝露から硝化菌を保護する機能を示さなかったためと考えられた。そこでアンモニア無機塩培地でアンモニア化成菌、アンモニア酸化菌、亜硝酸酸化菌で共培養することを繰り返し、徐々に鰹煮汁を有機物として添加、有機成分への耐性を高める馴化培養を進めた。その結果、硝酸生成能を示しながら最大で鰹煮汁 10g/L まで耐える組み合わせが見つかった。検討した 4 菌株のアンモニア化成菌では、アンモニア生成能の高い菌株は硝化菌の有機物の曝露から保護する機能が弱く、アンモニア生成能の低い菌株は硝化菌を保護する機能が高かった。

organic hydroponics, multiple parallel mineralization, nitrification

発表責任者：篠原信（shsh@affrc.go.jp）

講演番号：3C19a05
講演日時：3 月 19 日 10:20～ C 校舎 19 会場

# 難分解性有機塩素系殺虫剤の分解細菌コミュニティにおける非分解菌の役割

# Role of non-degrading bacteria in gamma-hexachlorocyclohexane-degrading bacterial community

○加藤 広海、大坪 嘉行、津田 雅孝、永田 裕二（東北大院生命）
○Hiromi KATO, Yoshiyuki OHTSUBO, Masataka TSUDA, Yuji NAGATA (Tohoku Univ.)

環境汚染物質の分解細菌を実際に汚染環境に接種しても十分な効果が得られないことがしばしば観察される。この問題は分解細菌がその環境に定着できなかったり、定着できても期待された分解能力を発揮できないことに主たる原因があるとされているが、分解菌と他者である土着菌との間にどのようなコミュニティが形成され得るのかに関してはほとんど情報がない。我々は、土壌の難分解性汚染物質の一つでもある有機塩素系殺虫剤γ-HCH（hexachlorocyclohexane）の分解コミュニティをモデルケースとして、分解菌と非分解菌との関係性について追求してきた。本研究では、（１）非分解菌との共在は分解菌にとって実際にアドバンテージがあるのか、（２）分解菌と非分解菌がどのようにして単離状態からコミュニティを形成するのか、を明らかにすることを目的としている。

メタゲノム解析によって、本γ-HCH 分解コミュニティは分解菌 *Sphingobium* sp. TKS 株と複数種の非分解菌によって構成されていることが明らかとなった。その中でも特にコミュニティ内での存在割合が高かった非分解菌の *Cupriavidus* sp. TKC 株と *Pseudomonas* sp. TKP 株、および分解菌 TKS 株の 3 株について、土壌での生残性を調べた。滅菌土壌にこれら 3 株を単独で接種して経時的に菌密度を測定した結果、TKC 株は接種後 1 週間以内にコロニー形成能を持つ細胞数が $10^9$ CFU/g soil まで増加したが、TKS 株と TKP 株は徐々に減少し、土壌に定着できなかった。しかしながら TKS 株は、TKC 株と混合して滅菌土壌に接種された場合に増殖できることから、土壌環境への定着において他者を必要とする場合があることが明らかとなった。

また TKC 株は固体培地上において、培地組成によって様々なコロニー形態をとることがわかり、一部の低栄養性培地にてコロニーが薄く拡がる現象が見られた。興味深いことに、TKS 株と混合して固体培地に接種すると、TKC 株のコロニーは薄く拡がる同時に TKS 株コロニーに向かって細胞増殖することがわかった。これらの結果は、γ-HCH 分解自体にとってのアドバンテージは不明ではあるものの、TKC 株が積極的に TKS 株とコミュニティを形成する可能性を示している。

bacterial community, soil, γ-hexachlorocyclohexane

発表責任者：加藤広海（katee@ige.tohoku.ac.jp）

講演番号：3C19a06
講演日時：3 月 19 日 10:45～ C 校舎 19 会場

フェナントレン分解細菌の生育阻害緩和に対する非分解細菌の生細胞の重要性
Suppression of growth inhibition of phenanthrene-degrading bacterial strain by non-degrading bacterial strains; depends on viable cells of the letter strains.
○小川 なつみ、加藤 広海、大坪 嘉行、永田 裕二、津田 雅孝（東北大院生命科学）
○Natsumi OGAWA, Hiromi KATO, Yoshiyuki OHTSUBO, Yuji NAGATA, Masataka TSUDA (Tohoku Univ.)

環境浄化に対するバイオレメディエーションの有効利用のために、様々な汚染物質分解細菌株が環境から単離され、分解メカニズムが解明されてきた。一方これら菌株の単離過程で、複数細菌種が共在する複合微生物系（コンソーシアム）が得られることがしばしばあった。しかし、その共在メカニズムが解明された例は限られている。コンソーシアムにおける細菌間の共在機構解明のため、我々は芳香族化合物汚染土壌から取得したフェナントレン分解能を有するコンソーシアム（MixEPa4）の解析を行ってきた。MixEPa4 から単離したフェナントレン分解細菌 *Mycobacteirum* sp. EPa45 株はフェナントレン含有最小固体培地で生育阻害を受けるが、コンソーシアム由来の非分解細菌 *Burkholderia* sp. Bcrs1W 株と混合培養することで生育阻害が緩和される（SGI 効果: Suppression of Growth Inhibition）効果を見出した。本研究では、遺伝学的な解析により①EPa45 株がフェナントレンにより生育阻害を受ける要因、②非分解細菌株が SGI 効果を示す要因の解明を目的とした。
①栄養培地で液体培養した EPa45 株において、フェナントレンを添加すると増殖が一時的に抑制されることが明らかとなった。蛍光顕微鏡観察の結果、増殖抑制時に死細胞の割合が著しく増加し、フェナントレン分解後に再び生細胞の割合が増えることで増殖が再開することから、生育阻害はフェナントレン分解と強く関連していることが考えられた。定量 PCR 解析の結果、フェナントレン添加条件で、推定フェナントレン分解遺伝子群が実際に発現しており、フタル酸を経由したフェナントレン代謝が起こる際に、細胞への何らかのダメージが生じている可能性が示された。
②これまでの解析により、Bcrs1W 株のみならず、モデル土壌細菌 *B. multivorans* ATCC 17616 株や Keio collection 親株の *E. coli* BW25113 株でも高い SGI 効果を発揮している（小川、農芸化学会 2016）。これらフェナントレン非分解細菌株は、本化合物含有最小固体培地のような貧栄養な培地であっても、単独で微小なコロニーを形成する能力が高かった。一方、Keio collection 全 3884 株から選抜できた 99 種の SGI 効果を示さない遺伝子破壊株は、微小なコロニーを形成する能力が著しく低下しており、これらの株を高菌密度で EPa45 株と混合すると SGI 効果が復帰した。このような現象は、ATCC 17616 株のアミノ酸要求性株おいても同様に確認された。さらに、非分解細菌株の高濃度の死細胞や粗酵素を接種しても、SGI 効果は発揮されなかったことから、SGI 効果の発揮には一定以上存在する非分解細菌の生細胞が重要であることが推定された。

Microbial consortium, Biodegradation, Phenanthrene

講演番号：3C19a07
講演日時：3 月 19 日 11:00～ C 校舎 19 会場

細菌集団におけるプラスミドの受容菌選り好み機構の発見と解析
Coexistence of multiple recipient candidates affects the conjugation selectivity of plasmids

○作田 郁子[1]、水口 千穂[1]、小曽根 郁子[2]、橋本 絢子[2]、小松 護[3]、新家 一男[4]、池田 治生[3]、森内 良太[5]、道羅 英夫[5]、新谷 政己[6]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1]（[1]東大生物工学セ、[2]JBIC、[3]北里大・北里生命研、[4]産総研、[5]静大・グリーン研、[6]静大院・工）
○Ayako SAKUDA[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1], Ikuko KOZONE[2], Junko HASHIMOTO[2], Mamoru KOMATSU[3], Kazuo SHIN-YA[4], Haruo IKEDA[3], Ryota MORIUCHI[5], Hideo DOHRA[5], Masaki SHINTANI[6], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]JBIC, [3]Kitasato Univ., [4]AIST, [5]Shizuoka Univ. RIGST, [6]Shizuoka Univ.)

【背景・目的】実環境でのプラスミドの挙動理解は細菌の進化適応過程を解明する上で重要である。本研究では、種々の細菌が混在する実環境下での接合伝達を想定し、供与菌 1 種に対し受容菌が同時に 2 種存在する接合（1:2 接合）を行い、第 2 の受容菌候補の存在がプラスミドの接合伝達に及ぼす影響の評価および複数の受容菌存在下でプラスミドの挙動を決定する因子の探索を目的とした。昨年度本大会において、異なる不和合性（incompatibility; Inc）群に属する 4 種のプラスミド pCAR1 (IncP-7)、NAH7 (IncP-9)、pB10 (IncP-1)、 R388 (IncW) について、*Pseudomonas putida* KT2440 株を供与菌とした 1:2 液体接合時に KT2440 株への接合伝達が優先される結果を報告した。本年度はこの条件に加え供与菌を *Pseudomonas resinovorans* CA10dm4 株とした接合およびフィルター上での接合実験を行い、また、BAC ライブラリースクリーニングによる原因因子探索を試みた。
【方法・結果】各プラスミドの接合伝達頻度（接合伝達体数 / 供与菌数）を算出し、1:1 接合および 1:2 接合結果を比較した。いずれのプラスミドも液体およびフィルター上での 1:1 接合時は両株へ同程度接合伝達した。1:2 接合時には、供与菌を KT2440 株とした場合、液体接合時と同様フィルター上でも KT2440 株へ優先して接合伝達する傾向が見られた（図 a)。供与菌を CA10dm4 株とした場合、液体接合時は CA10dm4 株への伝達が優先され、フィルター接合時は同様の傾向を維持したまま接合伝達頻度の上昇が見られた（図 b)。この「2 種の受容菌を見分ける」現象の原因としては、接合橋の安定性の違いや未知の受容菌認識機構が存在する可能性が考えられ、原因因子は供与菌、受容菌、プラスミドのいずれにも存在し得る。そのうち受容菌由来因子について、KT2440 株を供与菌とした 1:2 液体接合時に NAH7 が CA10dm4 株へ接合伝達しない現象に着目し探索を行った。受容菌 KT2440 株ゲノムから作製した BAC ライブラリーを受容菌 CA10dm4 株染色体上に挿入し、1:2 接合時に NAH7 の接合伝達が可能となった株を 300 のライブラリーより 16 株取得した。発表ではこの 16 株から単離した BAC クローンのシーケンス解析の結果についても報告する。

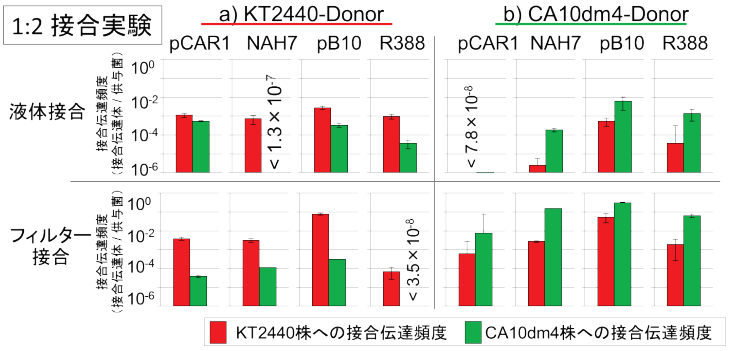



図. 各プラスミドの 1:2 接合実験
受容菌 *P. putida* KT2440 株への接合伝達頻度を赤、*P. resinovorans* CA10dm4 株への接合を緑で示した。縦軸は接合伝達頻度を表している。供与菌として(a)*P. putida* KT2440 株、(b)*P. resinovorans* CA10dm4 株を用いた結果を示した。

horizontal gene transfer, plasmid, conjugation

発表責任者：野尻秀昭（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3C19a08
講演日時：3 月 19 日 11:15～ C 校舎 19 会場

難培養放線菌 *Leucobacter*sp.212 株の Zn coproporphyrin 類による増殖機構の探索
Mechanism of action analysis of Zinc coproporphyrins, novel growth factors for previously uncultured *Leucobacter*sp. ASN212 strain.
○高井 亮吾、モハンマドナズルールイスラム ブイヤン、重冨 顕吾、鎌形 洋一、生方 信 (北大院農)
○Ryogo Takai, Bhuiyan Mohammad Nazrul Islam, Kengo Shigetomi, Yoichi Kamagata, Makkoto Ubukata (Hokkaido Univ.)

**研究背景、目的）** 活性汚泥より分離された *Leucobacter* sp.ASN212 株は、同じく活性汚泥より見出された *Sphingopyxis* 属 GF9 株が供給する増殖因子を受け取ることで増殖可能となる。増殖因子探索の結果、我々は GF9 株が生産する 6 種の coproporphyrin(Cop.)類が、ASN212 株に対する増殖因子であることを明らかにした [1)]。

Coproporphyrin I(Cop.I)及び coproporphyrin III(Cop.III)に対して、それぞれ 6 種類の金属（$Zn^{2+}$, $Fe^{2+}$, $Co^{2+}$, $Cu^{2+}$, $Ni^{2+}$）錯体を合成し、ASN212 株に対する構造活性相関を行った。その結果、Cop.I、Cop.III の $Zn^{2+}$および $Fe^{2+}$錯体が増殖活性を示した [2)]。以上の結果より、Cop.類の増殖因子は ASN212 株における heme 生合成関連経路に対して作用していると予想した。本研究では、BLASTp を用いたアミノ酸相同性検索による ASN212 株の heme 生合成経路の解析および、heme 生合成経路内における前駆体の調製、ASN212 株に対する増殖活性評価により、この予想を検証することを目的とした。

**実験、結果）** ASN212 株における heme 生合成経路の解析を行うために ASN212 株ゲノムの抽出およびアセンブルを行った。
得られたゲノムデータに対して、RAST server を用いた各 contig へのアノテーションを行った。続いて、近縁種である *Leucobacter komagatae* VKM ST2845 株における heme 生合成関連アミノ酸配列を用いて ASN212 株の全アミノ酸配列に対して BLASTp を用いた相同性検索を行った。最後に、ASN212 株のもつアミノ酸配列に対して BLAST データベース上のアミノ酸配列との相同性検索を行うことで ASN212 株における heme 生合成経路の探索を行った。

上記の探索の結果、ASN212 株を含む Actinobacteria 及び Firmicutes において知られる heme 生合成経路 [3)]（下図）の内、HemB, HemC 及び HemE が ASN212 株において欠損していることが明らかになった。また、これら 3 種の遺伝子は ASN212 株ゲノム上においてそれぞれ近接して存在していることも明らかになった。

上記の遺伝子解析の結果に対してさらなる知見を深めるために、heme 生合成経路において Cop.III の前駆体である coproporphyrinogen の調製を行い、ASN212 株に対して増殖活性評価を行うこととした。

Coproporphyrinogen の調製を行うための条件及び活性評価については現在検討中である。

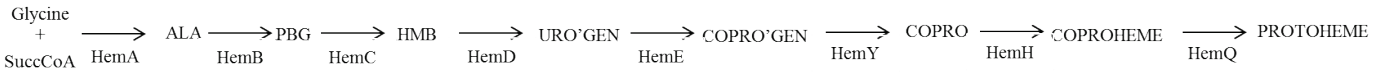



図. ASN212 株を含む Actinobacteria 及び Firmicutes において知られる heme 生合成経路
SuccCoA:succinyl-coenzymeA, ALA:5-aminolevulinic acid, PBG:porphobilinogen, HMB:hydroxymethylbilne, URO'GEN:uroporphyrinogen, COPRO'GEN:coproporphyrinogen, COPRO:coproporphyrin

参考文献） 1）M.N.I.Bhuiyan. *et al., J Antibiot.,* 1-7 (2015)
2）R.Takai *et al., Heterocycles, inpress*
3) H.A.Dailey. *et al*., *PNAS*., 2210-2215(2015)

uncultured bacteria, bacteria growth factor, porphyrin

発表責任者：高井 亮吾（casanova-snake@eis.hokudai.ac.jp）

講演番号：3C19a09
講演日時：3 月 19 日 11:30～ C 校舎 19 会場

プロピオン酸酸化細菌のプロピオン酸酸化からの水素生成に関与する因子の探索
Exploration of factors responsible for hydrogen production from propionate in propionate-oxidizing bacteria
○高坂 智之[1,2]、津島 由佳[1]、石口 貴之[3]、山田 守[1,2]（[1]山口大院・創科、[2]山口大中高温微生物セ、[3]山口大院・農）
○Tomoyuki KOSAKA[1,2], Yuka TSUSHIMA[1], Takayuki ISHIGUCHI[3], Mamoru YAMADA[1,2] ([1]Graduate School of Science and Technology for Innovation, Yamaguchi Univ., [2]YU-RCTMR, [3]Graduate School of Agriculture, Yamaguchi Univ.)

【目的】高温（55℃付近）で運転されるメタン発酵槽において特定の基質や不安定化により蓄積しやすいプロピオン酸は、プロピオン酸酸化細菌によって主に酢酸へと酸化され、その酸化に伴って生成される水素は水素資化性メタン生成菌によってメタンへと変換されている。この一連の反応において水素の蓄積が水素生成自体を阻害することから、プロピオン酸の酸化は系中の水素濃度が非常に低い時のみ進行することが知られる。しかしプロピオン酸酸化細菌からの水素放出はほぼ化学平衡レベルまで行われることから、プロピオン酸酸化細菌はプロピオン酸からの水素生成を効率よく行うメカニズムを有していると推察している。我々は、高温性プロピオン酸酸化細菌 *Pelotomaculum thermopropionicum* SI（SI）のプロピオン酸代謝経路をオミックス解析により予測し、SIが行うプロピオン酸代謝経路には3つの酸化反応があり、それぞれコハク酸、リンゴ酸、ピルビン酸が酸化される事を示唆した。しかし、その酸化に関与する遺伝子は明らかとなったものの生化学的な反応機構は明らかとなってはいない。一方、中温（37℃付近）のプロピオン酸酸化細菌ではコハク酸の酸化反応を膜電位がエネルギー的に補助していると示唆されている。そこで本研究では、SIにおけるプロピオン酸からの水素放出に膜電位が関与しているか、さらにはこの反応を補助する因子はないかについて検討した。
【方法・結果】まず、ピルビン酸で培養した SI 細胞を新しい培地に接種しプロピオン酸を加えて 55℃で保温したところ、20–30 日後に水素の放出が始まり、40–50 日後までエネルギー的な水素放出限界濃度である 50 Pa に到達するまで水素の放出が見られた。一方、プロピオン酸を基質として SI とメタン生成菌が共生培養している状態において、メタン生成菌の代謝を特異的な阻害剤で阻害した際には水素放出がすぐに開始されたことから、異なる基質で培養した細胞からではプロピオン酸からの水素放出開始にかなりの時間を要することがわかった。ゲノム解析より SI のプロピオン酸からコハク酸までの代謝経路には、コバラミン、パントテン酸、ビオチンなどの補酵素が必要であることが推察された。そこで、補酵素の水素放出への添加効果を検討したところ、コバラミンとパントテン酸で効果が見られる可能性が示唆された。一方、プロピオン酸からの水素放出への膜電位の関与を明らかにするため、脱共役剤である CCCP を添加し観察したところ、20 μM CCCP の添加により水素の放出が抑えられることが明らかとなった。このことから、高温性のプロピオン酸酸化細菌においてもプロピオン酸酸化経路、特にコハク酸酸化において膜電位が必要とされることが示唆された。

propionate-oxidizing bacteria, hydrogen production, succinate oxidation

発表責任者：高坂智之（tkosaka@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：3C19a10
講演日時：3 月 19 日 11:45～ C 校舎 19 会場

*Methylobacterium* sp. ME121 株の運動性向上を引き起こす因子の同定
Identification of factors that cause motility improvement of *Methylobacterium* sp. ME121
○薄井 祥明[1]、若林 佑[2]、清水 哲[3]、中村 顕[3]、伊藤 政博[1,2] ([1]東洋大・生命科、[2]東洋大院・生命科学、[3]筑波大・生命環境系)
○Yoshiaki USUI[1], Yuu WAKABAYASI[2], Tetsu SHIMIZU[3], Akira NAKAMURA[3], Masahiro ITO[1,2] ([1]Faculty of Life Sciences, Toyo Univ., [2]Graduate School of Life Sciences, Toyo Univ., [3]Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba)

【背景、目的】
自然界では多くの異なる生物同士が互いの生育環に影響を与えており、細菌も同様に異なる種属間で共生関係を構築し、互いに影響し合っていることが推察される。これまでの細菌研究では、単離した細菌を単独で使用することが主流であった。しかし、自然界では細菌同士が共生によって生活環を築いていることから、異なる細菌同士を意図的に混合培養する共培養の研究報告が増加している。しかし、異なる種属の細菌同士の共培養に関する研究は、生育や代謝産物に着目したものが多い。本研究では、共培養時における運動性の向上に着目して研究を行った。使用した *Methylobacterium* sp. ME121 株（運動性有り）と *Kaistia* sp. 32K 株（運動性なし）は同一の土壌サンプル中から単離された細菌である。これまで当研究室での研究結果より、ME121 株と 32K 株の共培養時と ME121 株のみの単独培養時で遊泳速度を比較すると共培養時の方が ME121 株の有意な運動性向上が観察された。また、ME121 株の遊泳速度は、32K 株の培養上清を用いた場合でも、運動性が向上したことから、32K 株培養上清に運動性向上因子（K 因子と命名）が存在することが推察された。本研究では、ME121 株の運動性向上を引き起こす 32K 株由来の K 因子の同定および細菌のべん毛モーターに着目し、運動性向上とモーター駆動力の関係を明らかにすることを目的とした。
【方法】
32K 株培養上清に存在する K 因子の同定のために、培養上清に含まれる成分の定量・定性分析を行った。また、K 因子による ME121 株の運動性向上機構の解明を行うために、ME121 株のべん毛モーターの回転力に着目して、モーター1 分子の回転計測法であるテザートセル法を用いて K 因子の有無でモーターの回転数がどのように変化するかを計測した。
【結果、考察】
K 因子は、32K 株が生産する菌体外多糖の一種であることが推定された。また、ME121 株のべん毛モーターは、K 因子の添加により回転速度の向上が観察された。結果の詳細は発表時に報告する。今後、K 因子の同定を進めていくとともに、運動性向上機構の詳細な解明のため、K 因子添加の有無でのべん毛モーターのトルク解析を行う予定である。

Co-culture, Motility, *Methylobacterium*

発表責任者：薄井 祥明（ysak4415@gmail.com）

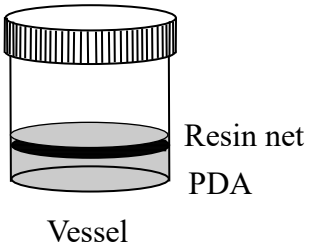
講演番号：3C19p01
講演日時：3 月 19 日 14:00～ C 校舎 19 会場

# 疎水性樹脂ネットによるカビ胞子の生産性の向上
# Enhancement of fungal spore production with hydrophobic resin nets

○小田 忍、城戸 良介、大箸 信一（金沢工大ゲノム研）
○Shinobu ODA, Ryousuke KIDO, SHINICHI OHASHI (Kanazawa Inst. Technol.)

【目的】 カビ胞子の生産場として寒天平板が多用されているが、培地の化学組成やその厚さによって胞子の生産量が大きく変動することが報告されている[1,2]。カビの胞子は発酵や微生物変換の種菌もしくは生体触媒、さらには生物防除剤として極めて有用であり、それのより効率的な生産法の開発が期待されている。一方、近年筆者らは、カビの胞子生産能や発酵能、アルカン水酸化活性が液/液界面の電荷や疎水性の変動によって大きく変化することを報告した[3–5]。そこで本研究では、寒天平板中に疎水性樹脂ネットを埋設することにより、カビの胞子生産能がどのような変化を来すかについて検討し、胞子の大量生産に有用かつ重要な知見を得ることを目的とした。
【方法】 表面から 3 mm の深さに polyethylene（PE）、polypropylene（PP）あるいは polytetrafluroethylene（PTFE）ネット（厚さ 1 mm、直径 46 mm、格子サイズ 2.5 x 2.5 mm）を埋設した 1/2 PDA プレート表面に、*Aspergillus* 属 4 株、*Penicillium* 属 2 株、*Trichoderma* 属 1 株、*Rhizopus* 属 1 株の胞子懸濁液（$10^6$ spores/ml）それぞれを 400 µl 植菌した。25 °C で 5 ないし 7 日間静置培養後にカビマット（1 $cm^2$）を切り出し、それらのホモジネート中の胞子数を顕鏡下、トーマの血球計算盤を用いて計測した。
【結果】 *R. oryzae* NBRC 4707 を除く 7 株で、PTFE 埋設系の胞子生産量はコントロール（ネットなし）に比べて向上し、特に *A. terreus* NBRC 29542 では 7.7 倍（8.5 x $10^7$ spores/$cm^2$）、*P. multicolor* IAM 7153 で 2.2 倍（5.9 x $10^7$ spores/$cm^2$）、*A. oryzae* RIB40 で 1.8 倍（2.6 x $10^7$ spores/$cm^2$）もの高値に達した。樹脂ネットの胞子形成促進効果はその表面疎水性（接触角）に比例して大きくなり、樹脂接触角と胞子生産量との間の決定係数（$R^2$）は、0.653～0.9985 の高値を示した。このことより、カビの基中菌糸が寒天ゲル中の疎水性樹脂ネットに接触することで、胞子生産が促進された可能性が示唆された。以上の結果より、寒天平板中に PTFE のような疎水性樹脂ネットを埋設するだけでカビの胞子生産量を大きく引き上げられることが明らかとなり、今後、産業上重要なカビ胞子の簡便な大量生産技術として展開していく価値があると思われた。

1) Drijfhout, E. and Jansen, J., Ned. J. Plant Pathol., **95**, 119–122 (1989).
2) Kamp, A.M. and Bidochka, M.J., Lett. Appl. Microbiol., **35**, 74–77 (2002).
3) Oda, S., *et al.*, J. Biosci. Bioeng., **114**, 596–599 (2012).
4) Oda, S., *et al.*, Process Biochem., **47**, 2494–2499 (2012).
5) Oda, S., *et al.*, J. Biosci. Bioeng., **115**, 544–546 (2013).




fungal spore, interface cultivation, hydrophobic resin

発表責任者：小田　忍（odas@neptune.kanazawa-it.ac.jp）

講演番号：3C19p02
講演日時：3 月 19 日 14:15～ C 校舎 19 会場

固体及び細胞の表面疎水性とバイオフィルム形成量の関係解明。
Relationship elucidation of biofilm formation amount and surface hydrophobicity of solid and cells.
○谷川 絢美[1]、小田 忍[2]、大箸 信一[2] ([1]金沢工大大学院、[2]金沢工大ゲノム研)
○Ayami TANIKAWA[1], Shinobu Oda[2], Shinichi Ohashi[2] ([1]Kanazawa Ins. Tec., [2]Kanazawa Ins .Tec.)

【目的】従来のバイオフィルム定量法では培養中に試験片からバイオフィルムが剥離する、単一の材料でしか計測することができない等の問題点が存在する。そこで、これらの問題点を解決でき、正確かつ汎用的なバイオフィルム定量法としての新規な定量法である Plate-hanging 法の確立を目的とした。また、菌体表面の疎水度を計測し、試験片並びに微生物菌体表面の疎水度とバイオフィルム形成量との関連性も調べた。

【方法】Plate-hanging 法：ガス滅菌済の 6 ウェルマルチプレートに菌体懸濁液を分注し、プラスチック製の試験片を固定したふたを被せて 24 時間又は 48 時間振とう培養(70 rpm)を行った。その後試験片を洗浄、超音波処理に供し、試験片に付着しているバイオフィルムの剥離を行った。剥離液を寒天プレートに塗布し、48 時間培養した後にコロニーカウントを行った。
疎水度：振とう培養後の菌体懸濁液を 3 度遠心分離して洗浄と集菌を行った。その後リン酸緩衝液に懸濁して原液とし、$OD_{400}$ 値で 0.5 に調製した。調製した懸濁液と hexadecane、*p*-xylene、toluene をボルテックスし、十分に層分離したことを確認した後に $OD_{400}$ 値を求めた。この値を {(0.5 - 測定値)/0.5×100} に当て、菌の疎水度を算出した。

【結果】*Staphylococcus epidermidis* NBRC 12993、*Pseudomonas putida* NBRC 14164 の 2 種のバクテリアのバイオフィルム形成量を Plate-hanging 法で確認した。*S. epidermidis* NBRC 12993 では、疎水度の低い polystyrene($\theta$ = 72 °C)への付着量が多く、*P. putida* NBRC 14164 では疎水度の高い polycarbonate($\theta$ = 78 °C)への付着量が多く見られる傾向となった。菌体表面の疎水度の試験では、*S. epidermidis* NBRC 12993 の疎水度は低く、*P. putida* NBRC 14164 の疎水度は高い結果が得られた。両結果より疎水度の低い試験片には疎水度の低い菌体が付着し、疎水度の高い試験片には疎水度の高い菌体が付着した。また、酵母についても同様の試験を行ったところ、バイオフィルム形成量と試験片の疎水度との相関性を確認することができた。

Biofilm, Hydrophobicity

発表責任者：谷川絢美（b1208850@planet.kanazawa-it.ac.jp）

講演番号：3C19p03
講演日時：3 月 19 日 14:30～ C 校舎 19 会場

異なる表面構造上におけるバイオフィルム形成機構の解析
Influence of surface topography on biofilm formation
○宮崎 俊、清川 達則、尾花 望、別役 重之、UTADA A. S、野村 暢彦（筑波大・生命環境）
○Shun MIYAZAKI, Tatsunori KIYOKAWA, Nozomu OBANA, Shigeyuki BETSUYAKU, A. S UTADA, Nobuhiko NOMURA (Univ. of Tsukuba)

バイオフィルム (BF)とは微生物が固体表面上に付着し、細菌と細菌自身が産生する細胞外マトリクスによって構成される集合体である。環境中では多くの微生物が BF を形成しており、形成段階として (i)鞭毛や線毛のような細胞小器官の働きによる細菌同士や固体表面上への初期付着 (ii)運動性や増殖を介したマイクロコロニーの形成 (iii)細胞外マトリクスの生産をともなった BF の成熟という過程が報告されている。また微生物は BF を形成することで、浮遊状態と比較して外部ストレスからの耐性を獲得する。そのため BF は複雑な環境に適応するうえで重要な構造体と考えられている。

BF 形成初期には疎水性、親水性、電荷などの物理化学的な力、あるいは流れなどの細胞表層への力学的な力が物質への付着を促しうることが知られている。これ以外にも固体表面の形態及び構造は BF の形成において重要な因子である可能性が考えられる。現在までにもこのような表面構造を模して、様々な表面構造上で微生物の付着検討は行われてきた。しかしながら、表面構造の違いと微生物付着機構の関連性について詳細なメカニズムは明らかになっていない。そこで本研究では上記にあるような (i)BF 形成の初期付着 (ii)マイクロコロニーの形成 (iii)BF の成熟という BF 形成過程に着目して、表面構造と微生物付着メカニズムの解明を目的に研究を進めた。

まず異なる表面構造を再現するため、polydimethylsiloxane (PDMS)素材を用いた。PDMS は構造を自在に変形でき、生体毒性が低いという特徴から、微生物の解析に使われている。このような特性の PDMS を用いて様々な表面構造を作製し、BF 研究に使われている代表的なモデル微生物を用いて PDMS 上で付着試験を行った。試験の評価方法としては、当研究室で開発された非染色かつ非破壊的な 3 次元構造の観察を可能にする COCRM (Continuous Optimizing Confocal Reflection Microscopy)法により表面構造自体の詳細な観察を行い、同時に、CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy)法による微生物の蛍光観察を組み合わせることで、デバイス表面構造と菌体を経時的かつ 3 次元的に可視化した。本発表では表面構造と BF 形成の関係について、その解析結果を報告する。

biofilm formation, surface topograpy, bacterial adhesion

発表責任者：野村暢彦（nomura.nobuhiko.ge@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3C19p04
講演日時：3 月 19 日 14:45～ C 校舎 19 会場

# 非生物素材に付着した大腸菌 O157 のバイオフィルム形成

# Biofilm formation of Escherichia coli O157 attached to abiotic surfaces

○横井川 久己男[1]、高橋 啓子[2]、金丸 芳[1] ([1]徳島大院・生物資源、[2]徳島大院・総合科学)
○Kumio YOKOIGAWA[1], Keiko TAKAHASHI[2], Kaori KANEMARU[1] ([1]Tokushima Univ. BB, [2]Tokushima Univ. IAS)

〈目的〉大腸菌 0157 は、胃の酸性バリアーを容易に通過できる高い酸耐性を有し、数細胞でも経口感染すると報告されている。本菌が混入した食材は直接の感染源となるだけでなく、食品製造設備や調理器具を介して食品の二次汚染を引き起こすが、非生物素材に付着した本菌のバイオフィルム形成に至る過程は不明な点が多い。我々は、これまでに種々の条件下で、各種非生物素材に対する本菌の付着性を明らかにして報告した（1）。本研究では、非生物素材に付着した大腸菌 0157 のバイオフィルム形成に至る過程を調べた。

〈実験材料と方法〉非生物素材として、ステンレス、チタン、ガラス、アルミニウム、プラスチック類を使用した。菌株は大腸菌 0157sakai 株を使用し、LB 培地を用いて 37℃で 16 時間振とう培養した。生理食塩水で希釈した細菌懸濁液と非生物素材（シャーレ又は 5×5 cm のシート）を 25℃で 30 分間接触させ、細菌が付着した素材表面を洗浄後、EMB 寒天培地を流し入れて、37℃で 48 時間培養し付着細胞数を測定した。また、細胞が付着した非生物素材に 1/10 濃度の LB 培地（0.1%トリプトン、0.05%酵母エキス、0.05%NaCl、pH 7.0）を加え、25℃でバイオフィルムを形成させた。バイオフィルム量はクーマジーブリリアントブルー（CBB）染色法で測定した。

〈結果及び考察〉非生物素材に付着した大腸 0157 は、付着の初期段階から、浮遊細胞より次亜塩素酸ナトリウムに対する耐性が上昇し、付着後 48 時間から 72 時間で急激に殺菌に必要な次亜塩素酸ナトリウム濃度が増大した。CBB 染色からも、付着後数日でバイオフィルムが形成されると考えられた。また、ステンレス、ガラス、プラスチック類の順で、バイオフィルム形成速度が速いと考えられた。

1. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to abiotic surfaces of cooking utensils.
Tsuji M, Yokoigawa K. J Food Sci. 2012 Apr;77(4):M194-9.

Escherichia coli O157, attachment, Biofilm

講演番号：3C19p05
講演日時：3 月 19 日 15:00～ C 校舎 19 会場

乳酸酸性下における乳酸菌と酵母の共凝集現象の解析
Analysis of co-aggregation between yeast and lactic acid bacteria under acidic conditions of lactic acid
○近藤 陽香、平井 智美、川澄 俊之（日女大家政）
○Haruka KONDO, Satomi HIRAI, Toshiyuki KAWASUMI (Japan Women's Univ.)

【目的】乳酸発酵による酸性環境は自然界に広く存在し、乳酸による pH 低下作用や強い抗菌作用によって、微生物にとっては生存し難い過酷な環境であると理解されている。しかし乳酸菌と酵母の共存例なども報告されており、この環境は決して無菌環境ではなく、ここに適応した多数の微生物が相互作用を行いながら生存しているものと推測される。当研究室では、漬物由来の乳酸菌と酵母が、乳酸水溶液中（pH3.0）で著しく共凝集することを見出した。共凝集に関する先行研究は中性付近での報告が多く、酸性下における共凝集に関する知見は乏しい。本研究では、乳酸酸性環境下における乳酸菌と酵母の共凝集現象に着目し、そのメカニズムや生存率への影響、バイオフィルム形成量などを検討することで、乳酸酸性環境下における微生物間相互作用に関する新たな知見を得ることを目的とした。
【方法】pH を調整した乳酸水溶液に懸濁した乳酸菌・酵母（10：1）について、懸濁後 30 分間の凝集性を目視あるいは顕微鏡観察で評価した。供試菌株は当研究室保有菌株の中で顕著な凝集がみられた *Lactobacillus paracasei* N9 株（以下 N9）、*Meyerozyma guilliermondii* K25 株（以下 K25）などを用い、凝集の至適 pH の測定、菌体のトリプシンまたは proteinaseK 処理、界面活性剤処理、糖類の添加、などを検討し共凝集に関与する因子を明らかにした。生存率の測定はコロニー計数法で行った。また、バイオフィルム形成量はクリスタルバイオレット法により評価した。
【結果・考察】[1]N9 と K25 の共凝集の至適 pH は pH3 付近にあり、pH7 では共凝集がみられなかった。また、N9 と K25 の共凝集には酵母表層成分が関与していることが考えられ、この因子について現在精査中である。[2]N9 単独よりも、K25 との凝集状態の方が、死滅が遅くなる傾向がみられた。また、膜(Polycarbonate Membrane Transwell Inserts、Corning 製)で隔てた共培養での生存率を評価した結果、酵母の代謝産物も影響を与えている可能性が示唆された。生存率はコロニー形成法で算出したが、VBNC 状態への移行の可能性に関しても検討を行った。[3]乳酸菌単独の場合はバイオフィルムを形成しないが、酵母単独の場合、pH7.0、pH3.0 において顕著にバイオフィルムの形成がみられた。また、乳酸菌、大腸菌、黄色ブドウ球菌等、他の細菌と共培養するとバイオフィルム形成量に変化がみられ、pH や菌株の組み合わせによっても差がみられた。
以上の結果より、pH3 付近の乳酸酸性環境下においても、微生物間での様々な相互作用が行われ、適応生存していることが推測された。

lactic acid bacteria, yeast, co-aggregation

講演番号：3C19p06
講演日時：3 月 19 日 15:25～ C 校舎 19 会場

分裂酵母 *ura4* 破壊株の細胞溶解に関連する培地成分の解析
Analysis of media components related to cell lysis in the fission yeast *ura4* gene mutants
○西野 耕平、櫛間 満咲、松尾 安浩、川向 誠（島根大・生物資源科学・生命工）
○KOUHEI NISINO, MISAKI KUSHIMA, YASUHIRO MATSUO, MAKOTO KAWAMUKAI (Shimane University)

ポリペプトンはカゼインタンパク質を酵素消化したもので単一のアミノ酸や低分子量のペプチドを含むため窒素源、アミノ酸源として使用される培地成分である。ポリペプトンを含む YPD 培地は出芽酵母の生育によく用いられているが、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe*（以下 *S. pombe*）の培養時には生育を阻害的することが知られており使用は敬遠されている。また、酵母エキスは酵母の抽出物であり微生物培養時の培地基材として広く使用されている。ポリペプトンや酵母エキスは培地に添加することで酵母を生育させる必要成分を含んでいる一方で、その詳細な成分や微生物の生育に与える影響等は知られていない。また、製造方法によっても成分は異なる可能性があり実験の再現性にも影響する。それゆえ、培地中の成分が酵母の表現型にどのような影響を与えるかは重要な情報である。

我々の研究室において *S. pombe* の *ura4* 遺伝子破壊株（*⊿ura4* 株）を YPD 培地で生育させると劇的な細胞溶解を示すことを見出しており、その原因の一つが Ura4 の反応の前駆体である OMP の蓄積にある可能性を示している 1,2)。本研究では、*S. pombe* が培地中のどの成分に対して影響を受け細胞溶解が起こるのかを明らかにすることを目的としている。

我々はメーカーが異なる酵母エキスを使用すると細胞溶解度に差が出ることを見出した。*⊿ura4* 株の細胞溶解を抑圧するウラシルの濃度を測定すると酵母エキス間で差があった。次に培地成分に細胞溶解促進物質が含まれていると考え、酵母エキスやポリペプトン中の成分を GC-MS を用いて定性分析を行った。その結果、細胞溶解を促進すると思われる候補成分として尿素を見出した。実際に尿素を培地に添加すると *⊿ura4* 株の細胞溶解が顕著に誘導されることを明らかにした。次に尿素が細胞溶解にどの様に関与しているかを調べる為に Urease をコードする *ure2* に着目した。Ure2 は尿素を加水分解することでアンモニウムイオンを生成する反応を担っている。そこで、*⊿ura4⊿ure2* 株を作成し、細胞溶解を起こすかを調べると、尿素添加による細胞溶解が顕著に抑圧された。また、尿素を添加することで分裂酵母のウラシル要求性株の生育が阻害されることも見出した。以上の結果より、ポリペプトンや尿素を培地に添加すると細胞内アンモニウムイオン濃度が上昇し、ウラシルの取り込みあるいは代謝が阻害され、ウラシル要求性株の生育阻害や *⊿ura4* 株での OMP 蓄積が起こるのではないかと考えている。

1) Matsuo et al. PLoS ONE 2013; 2) Nishino et al. PLoS ONE 2015

Media, Urea, Cell lysis

発表責任者：西野　耕平（nishinokouhei890531@gmail.com）

講演番号：3C19p07
講演日時：3 月 19 日 15:40～ C 校舎 19 会場

# 分裂酵母でリン脂質ホスファチジルセリンあるいはホスファチジルエタノールアミンの欠損は、硫化水素の発生を引き起こす

# Defect of phosphatidylserine or phosphatidylethanolamine causes production of sulfide in fission yeast

○松尾 安浩、川向 誠（島根大・生物資源・生命工）
○Yasuhiro MATSUO, Makoto KAWAMUKAI (Shimane Univ.)

分裂酵母では、グリセロリン脂質の合成経路はあまり解析されていないが、CDP-DAG(シチジン二リン酸ジアシルグリセロール)からPps1によってホスファチジルセリン(PS)が合成される。PSは、Psd1、Psd2、Psd3によってホスファチジルエタノールアミン(PE)になり、Cho1及びCho2によってホスファチジルコリン(PC)が合成される。これまでに、*pps1*欠損株(PS欠損)や*psdΔx3*株(*psd1 psd2 psd3* 三重欠損株：PE 欠損)で、生育阻害、細胞形態の異常、細胞質分裂異常などの表現型を示すことを明らかにしている。また、これらのほとんどは、エタノールアミンを培地に加えることで抑圧される。今回、新たに*pps1Δ*株及び*psdΔx3*株が細胞増殖時に硫化水素を発生していることを見出した。そこで、本研究では、リン脂質合成欠損株での硫化水素の発生に関して解析を行なった。

*pps1Δ*、*psdΔx3*、*cho1Δ*及び*cho2Δ*を用いて、硫化水素を定量化した。結果として、*pps1Δ*及び*psdΔx3*では、エタノールアミンの有無に関わらず硫化水素を発生しており、*cho1Δ*及び*cho2Δ*では硫化水素を検出できなかった。次に、3つのPE合成遺伝子欠損の組み合わせで、解析を行なった結果、単独破壊や二重破壊の組み合わせでは、ほとんど硫化水素を発生していなかった。以上のことから分裂酵母でのリン脂質合成経路ではPSあるいはPE合成の完全な欠損によって硫化水素の発生が起こっていた。

分裂酵母における硫化水素の代謝は、sulfide-キノン酸化還元酵素であるHmt2を介して、コエンザイムQの還元によって代謝される。そこで、*pps1Δ*及び*psdΔx3*でのHmt2の局在及び発現を解析したが、野生株と比較して、変化はみられなかった。また、コエンザイムQ欠損株で硫化水素が発生するため、コエンザイムQ量を定量したが、*pps1Δ*及び*psdΔx3*で、ほとんど変化はみられなかった。

呼吸欠損株において、硫化水素を発生するという表現型が報告されている。そこで、*pps1Δ*及び*psdΔx3*を用いて、呼吸欠損の表現型を示すか解析した。栄養培地の炭素源である3%グルコースを0.1%グルコースと3%グリセロールに変え、非発酵培地でのそれぞれの株の生育を解析した。その結果、*pps1Δ*では、エタノールアミン存在下でも生育が悪く、*psdΔx3*株ではエタノールアミン非存在下で生育が悪くなっていた。また、酸素消費量を解析したところ、*pps1Δ*及び*psdΔx3*は、酸素を消費していないことが明らかになった。

以上のことから、グリセロリン脂質のうちPSあるいはPEの欠損は、細胞内での硫化水素代謝に影響を及ぼし、呼吸欠損の表現型を示すことを明らかにした。

phospholipid, sulfide, the respiratory defect

発表責任者：松尾安浩（ymatsuo@life.shimane-u.ac.jp）

講演番号：3C19p08
講演日時：3 月 19 日 15:55～ C 校舎 19 会場

# 酵母の活性型 Pkc1 の過剰発現による細胞死とキチン合成酵素の局在変化

# Overexpression of the constitutively-activated Pkc1 causes cell death and alteration of chitin synthase.

○福井 健人[1]、野村 亘[2]、井上 善晴[1]([1]京大院・農・応生科、[2]京大院・農・食品生物)
○Kento FUKUI[1], Wataru NOMURA[2], Yoshiharu INOUE[1] ([1]Div. of Appl. Life Sci., Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ., [2]Div. of Food Sci. & Biotechnol., Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ.)

出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）は、唯一のプロテインキナーゼ C 遺伝子として *PKC1* を持つ。Pkc1 は細胞壁の健全性維持やアクチン細胞骨格の制御に関与し、Pkc1 の機能的下流には Mpk1 MAP（mitogen-activated protein）キナーゼ経路がある。Pkc1 の構成的活性化変異体（$Pkc1^{R398P}$）の過剰発現は細胞死を誘導するが、その機構については明らかになっていない。そこで本研究では、$Pkc1^{R398P}$ の過剰発現による細胞死のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

*$PKC1^{R398P}$* 遺伝子を *GAL1* プロモーター下流に連結し、ラフィノース培地で培養し、2%ガラクトースを添加することで発現を誘導した。その結果、ガラクトース添加後 30 分で $Pkc1^{R398P}$ の発現が認められ、それに伴い Mpk1 のリン酸化が起こった。また、Mpk1 の欠損株では $Pkc1^{R398P}$ の過剰発現による細胞死が抑制された。Mpk1 は、主に細胞壁の健全性維持に関係する遺伝子の転写調節因子を制御している。そこで今回、細胞壁構成成分の一つであるキチンに着目した。キチンは酵母細胞壁成分の 1～2%程度しか存在せず、bud neck や出芽痕に多く分布している。$Pkc1^{R398P}$ の過剰発現によりキチンが細胞壁全体に蓄積した。さらに、キチン合成酵素をコードする *CHS3* の欠損株では、$Pkc1^{R398P}$ の過剰発現による細胞死が抑制された。これらのことから、構成的活性型 Pkc1 の過剰発現による細胞死とキチンの蓄積との関係が示唆された。

*CHS3* の発現は Mpk1 MAP キナーゼ経路を介して制御されるが、Mpk1 下流の転写因子 Rlm1 の欠損株でも $Pkc1^{R398P}$ の過剰発現による細胞死が抑制された。さらに、Rlm1 により転写調節される機能未知遺伝子 *PRM5* の欠損株でも $Pkc1^{R398P}$ の過剰発現による細胞死が抑制され、キチン分布の異常も抑圧されたことから、Prm5 がキチン合成に関与することが示唆された。

Prm5 のキチン合成への関与を探るため、Chs3 の細胞内局在を観察した。Chs3 は通常、bud neck やキトソームと呼ばれる小胞に局在するが、$Pkc1^{R398P}$ の過剰発現によってキトソーム局在が消失し、細胞膜全体への局在が新たに観察されるようになった。一方、Mpk1 や Prm5 の欠損株では、$Pkc1^{R398P}$ の過剰発現による Chs3 の細胞膜への局在は認められなかった。以上のことから、$Pkc1^{R398P}$ の過剰発現による細胞死は、Mpk1 MAP キナーゼ経路を介した Chs3 の細胞膜全体への局在によってキチンが異常に蓄積されたために引き起こされること、また Prm5 が Chs3 の輸送に関与している可能性が示唆された。

yeast, protein kinase c, chitin

講演番号：3C19p09
講演日時：3 月 19 日 16:10～ C 校舎 19 会場

出芽酵母の *S*-アデノシルメチオニン合成が関与する寿命制御機構の解析
Stimulating *S*-adenosyl-L-methionine synthesis extends lifespan via activation of AMPK
○小川 貴史[1]、椿山 諒平[1]、金井 宗良[2]、藤井 力[2]、平田 大[3]、水沼 正樹[1]([1]広島大院・先端研、[2]酒総研、[3]朝日酒造・研究開発)
○Takafumi OGAWA[1], Ryohei TSUBAKIYAMA[1], Muneyoshi KANAI[2], Tsutomu FUJII[2], Dai HIRATA[3], Masaki MIZUNUMA[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]NRIB, [3]Asahi-shuzo Sake Brewing Co., Ltd.)

【目的】

老化・寿命制御メカニズムの解明は、生物学的老化の理解だけでなく、寿命の維持や健康の増進のために重要である。メチオニン制限やカロリー制限(Calorie Restriction:CR)に代表される食餌制限は多くのモデル生物で寿命を延長させ、そのメカニズムが解析されてきた。さらに近年、いくつかの代謝産物が食餌制限を模倣して寿命延長に関与することが報告されている。しかし、代謝と寿命制御が関わる分子メカニズムの詳細は明らかになっていない。

本研究では、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用い、メチオニン代謝が関与する寿命制御機構について解析を行った。メチオニン代謝において *S*-アデノシルメチオニン(AdoMet)は各種生体分子のメチル化反応のメチル基供与体として利用される。AdoMet はメチオニン(Met)と ATP により生合成され、メチル基転移後、*S*-アデノシルホモシステイン(AdoHcy)となる。AdoHcy はメチル化反応を競合的に阻害するため *S*-アデノシルホモシステイン水解酵素 *SAH1* により速やかに分解される。

【方法・結果】

*sah1-1* 変異株が短命を示すことを見出したことから、*sah1-1* 変異株の増殖遅延を抑圧する変異株のスクリーニングを行い、*SSG1-1(Spontaneous Suppressor of Growth-delay of the sah1-1)*変異株を取得した。*SSG1-1* 変異株は AdoMet および AdoHcy を高蓄積し、長寿となることが明らかになった。*SSG1-1* 変異株の寿命延長機構について解析を行った結果、*SSG1-1* 変異株は AdoMet 合成酵素 *SAM1/2* を破壊すると寿命が抑圧され、AdoMet の合成が寿命延長に必要であることが分かった。さらに、*SSG1-1* 変異株は AdoMet の合成により Met と ATP を消費し、細胞内エネルギーセンサーSnf1(ヒト AMPK のオルソログ)を活性化した。さらに、*SSG1-1* 変異株は CR を模倣し、長寿となることを発見した。このことから、AdoMet の合成の促進が寿命を延長させるメカニズムを予想し、AdoMet 合成酵素過剰発現株 *GAL1-SAM1/2* を構築したところ、期待通り AdoMet の高蓄積と寿命延長が観察された。以上、メチオニン代謝による寿命制御機構を初めて明らかにした。

*Saccharomyces cerevisiae*, lifespan, *S*-adenosylmethionine

発表責任者：小川貴史（d152762@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：3C19p10
講演日時：3 月 19 日 16:25～ C 校舎 19 会場

# 出芽酵母の *S*-アデノシルメチオニントランスポーター*SAM3* が関与する寿命制御機構の解析

# Analysis of *SAM3*, which encodes *S*-adenosyl methionine transporter, in the regulation of lifespan in budding yeast

○種谷 麻由佳、小川 貴史、久米 一規、水沼 正樹（広島大院・先端研）
○Mayuka Tanetani, Tkafumi Ogawa, Kazunori Kume, Masaki Mizunuma (Hiroshima Univ.)

[目的] 近年、モデル生物を用いた解析により寿命は遺伝子レベルでも制御され、それに関わる経路や分子が徐々に明らかになってきた。寿命制御関与メカニズムの理解は生活習慣病などの加齢による疾患の理解にもつながることから本制御機構の解明はヒトの健康寿命の延長の基盤研究として極めて重要である。出芽酵母は他のモデル生物より寿命が短く、寿命・老化の基盤研究を進める上で大きなメリットとなるため、老化・寿命研究における最もシンプルなモデル生物として利用されている。

これまでに我々は、メチオニン代謝経路が関与する寿命延長機構を明らかにするために、生体内のメチル基供与体として知られている *S*-アデノシルメチオニン(SAM)を高蓄積する長寿変異株を取得した。この寿命延長は SAM 合成の促進が重要であることを見出した。本メカニズム解明の過程で、細胞膜に局在する高親和性 SAM トランスポター*SAM3* の破壊株は野生株よりも顕著に長寿となることが分かった。そこで、本研究では*Δsam3* 破壊株の寿命延長機構を解明することを目的とする。

[方法・結果] まず、*Δsam3* 破壊株の酸化ストレス、熱ストレスに対する耐性について調べたところ、熱ストレスに耐性を示すことがわかった。また、栄養応答経路である TOR(target of rapamycin)経路は翻訳制御やオートファジーなどを介して寿命を制御し、免疫抑制剤 Rapamycin によって阻害されることが知られている。そこで、Rapamycin の対する耐性についても調べたところ、強い感受性を示した。これにより、*Δsam3* 破壊株における寿命延長には TOR 経路が関与することが予想された。現在、Δ *sam3* と TOR 経路との関連について詳細を解析中である。

yeast, life span, *S*-adenosylmethionine

講演番号：3C19p11
講演日時：3 月 19 日 16:50～ C 校舎 19 会場

# オリゴペプチド輸送体の基質特異性
# Substrate specificity of oligopeptide transporters

○北村 憲司（広島大自然科学研セ）
○Kenji KITAMURA (Hiroshima Univ.)

【目的】　細胞外オリゴペプチドは細胞へのアミノ酸や窒素源の供給源になる他，血圧低下をはじめ特異的な生理作用を示すものも存在する事から，ペプチド含量を高めた食品やサプリメントなども上市されている。細胞膜上のジ・トリペプチド輸送体としては，原核・真核細胞を問わず保存性の高い POT ファミリー輸送体が知られているが，一部の真核微生物に新たな FOT ファミリーのペプチド輸送体の存在が報告された。出芽酵母 *S. cerevisiae* は POT ファミリー輸送体の Ptr2 を発現しているが，ワイン醸造用株は Ptr2 に加えて，実験室株や日本酒醸造用株にはない FOT ファミリー輸送体も有している。本研究では酵母の二種のペプチド輸送体の基質特異性を調べた。
【方法・結果】　POT ファミリー輸送体（酵母 Ptr2，マウス PepT1）と，ワイン酵母由来の新たな輸送体ファミリーである Fot1 について，実験室株の *S. cerevisiae ptr2* 破壊株で発現し，ジペプチドの利用能を指標に各々の基質特異性を評価した。また，各種実用 *S. cerevisiae* 株そのもののジペプチド利用能についても調べた。マウス PepT1 は酵母でも機能したが，ヘテロな系での発現のためか，酵母自身の輸送体に比べ活性は全体的に低かった。Ptr2 と Fot1 はどちらも，調べたジペプチドの多くを利用できたが，一方の輸送体を発現する細胞でのみ利用できるペプチドも存在した。人工甘味料のアスパルテームは非天然ジペプチドだが，Ptr2 ではほとんど取り込まないものの，Fot1 の良い基質であり，酵母の栄養になることがわかった。一般的にペプチド輸送体の基質特異性は厳密ではなく，オリゴペプチド類に加えて多種多様な薬物も輸送できるため，ヒト PepT1，PepT2 はドラッグデリバリーの観点からも注目されている。ペプチド性抗生物質について調べたところ，Ptr2，Fot1 のいずれか一方が優先的に輸送すると思われるものが見つかった。

peptide transporter, yeast, peptidomimeitc antibiotic

発表責任者：北村憲司（kkita@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：3C19p12
講演日時：3 月 19 日 17:05～ C 校舎 19 会場

# 酵母 *Kluyveromyces marxianus* のラクトース資化能を向上させるトランスポーター遺伝子の同定
# Identification of the transporter gene responsible for lactose utilization ability in the yeast *Kluyveromyces marxianus*

○廣田 潤哉、星田 尚司、赤田 倫治（山口大院創成科学化学系）
○Junya HIROTA, Hisashi HOSHIDA, Rinzi AKADA (Dept.Appl.Chem.,Yamaguchi Univ)

酵母 *Kluyveromyces marxianus* は高温でエタノール発酵が行えるだけでなくラクトース、セロビオースなど様々な糖を資化することが可能であり、一般にエタノール発酵で用いられる酵母 *Saccharomyces cerevisiae* と比べ広範なバイオマスを原料にしたエタノール生産が期待できる。*K. marxianus* の入手できる 20 株をラクトース培地で増殖を調べたところラクトース資化能は株によって大きく異なっていた。そこでラクトース資化能が高い NCYC1429 株とラクトース資化能が低い DMKU3-1042 株を選び、*K. marxianus* のラクトース資化能に重要な遺伝子を調べた。

ラクトースはグルコースとガラクトースからなる二糖なので、まずグルコース及びガラクトースそれぞれを炭素源とした場合の増殖を比較した。その結果、どちらの糖においても両株の増殖速度は同じで、最終細胞濃度も同程度であった。次にラクトースをグルコースとガラクトースに分解する酵素である β-ガラクトシターゼの活性を比較すると、ラクトース資化能の高い NCYC1429 の方が DMKU3-1042 よりも約 6 倍高い活性を示した。β-ガラクトシターゼ活性が資化能に影響していると考え、DMKU3-1042 で NCYC1429 由来の β-ガラクトシターゼ遺伝子を過剰発現させた。酵素活性は NCYC1429 と同程度にまで増加したものの増殖能に向上は見られなかった。これらの結果からラクトース資化の最初の過程、つまりラクトースの取り込みに違いがあると考えた。DMKU3-1042 株のゲノムには 14 個の糖トランスポーター遺伝子候補が同定されている。そこで、これらの 14 個のトランスポーター遺伝子を増幅するためのプライマーを DMKU3-1042 の配列を元に設計し、NCYC1429 ゲノムから PCR で合成し、DMKU3-1042 株で過剰発現させてラクトース培地での増殖を調べた。その結果 *LAC12* 遺伝子を導入した形質転換体ではラクトース資化能が高くなり、他のトランスポーターをコードする遺伝子を導入した形質転換体ではほとんど変化は見られなかった。さらに DMKU3-1042 由来の *LAC12* を過剰発現させても増殖に変化がなかった事から NCYC1429 由来の *LAC12* 遺伝子がコードするトランスポーターの輸送能がラクトース培地での *K. marxianus* の増殖能を向上させていると考えられる。NCYC1429 株の *LAC12* 遺伝子配列を決定し、推定アミノ酸配列を DMKU3-1042 のものと比較すると 19 か所でアミノ酸配列が異なっていることが分かった。

*Kluyveromyces marxianus*, Lactose, Transporter

発表責任者：星田　尚司（hoshida@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：3C19p13
講演日時：3 月 19 日 17:20～ C 校舎 19 会場

# 細胞が環境グルコース濃度を認識し、グルコース輸送体の発現を調節する分子機構の解明

# Molecular mechanism sensing extracellular glucose level in Schizosaccharomyces pombe.

○寺田 祐子、齋藤 成昭（久留米大　分生研）
○Yuko TERADA, Shigeaki SAITOH (Kurume Univ.)

【背景】グルコースはエネルギー源・炭素源として、生命の維持に欠かせない栄養素である。しかし、細胞外が常にグルコースに富むとは限らないため、栄養環境に応じてグルコースの取り込みを制御することが細胞の生存や機能に重要であるが、その分子機構は明らかでない。

我々は、分裂酵母がグルコース環境の変化に順応するために、グルコース輸送体 glucose hexose transporter 5（Ght5）の発現を変化させてグルコースの取り込みを調節していることを明らかにした[MBoc, **26**, 373, 2015]。高濃度グルコース培地では Ght5 の発現は抑制され、低濃度グルコース培地では Ght5 の発現は誘導される。同様に、哺乳細胞では Glucose transporter 1（GLUT1）の発現が培地のグルコース濃度に応じて調節される。しかし、分裂酵母、哺乳細胞において、環境中のグルコース濃度を認識し、グルコース輸送体の発現を調節する分子機構は明らかでない。

【目的】本研究では、真核生物のモデル細胞として分裂酵母を用い、細胞がグルコース環境の変化を認識して、グルコース輸送体 Ght5 の発現を調節する分子機構を明らかにすることを目的とする。

【方法】Ght5 の発現調節に関与する糖代謝産物や代謝関連遺伝子を調べるために、様々な糖で Ght5－GFP 株を培養し、そのときの Ght5－GFP の局在を調べた。グルコースの代謝経路を基準として、グルコース解糖系の途中から代謝系に加わる糖（フルクトース、マンノース、グルコン酸、グリセルアルデヒド、ジヒドロキシアセトンなど）、代謝されない、代謝が途中で止まる糖（3－*O*-メチルグルコース、2-デオキシグルコースなど）の 20 種の糖を用いた。

具体的には、低濃度（4.4 mM）グルコース EMM2 培地で Ght5－GFP 株を培養し、Ght5 の発現を誘導した。そこに上記の糖を一種類だけ添加し、このときの倍加時間、Ght5－GFP の局在を顕微鏡観察で調べた。

【結果・考察】低濃度グルコースによる Ght5 の発現は、高濃度のグルコース、フルクトース、マンノースで抑制された。一方、グルコン酸、グリセルアルデヒド、ジヒドロキシアセトンは濃度に関わらず Ght5 の発現を抑制しなかった。Ght5 の発現を抑制する糖の共通点の一つとして、ヘキソキナーゼ代謝を受けるということがあった。そこで、ヘキソキナーゼが Ght5 の発現調節に関与するか否かを調べるために、ヘキソキナーゼ遺伝子破壊株（*hxk1Δ*、*hxk2Δ*）を作成した。現在これらの株において、4.4、111 mM グルコース、フルクトース EMM2 培地における Ght5 の発現を調べている。

Schizosaccharomyces pombe, glucose transporter, hexokinase

発表責任者：寺田祐子（terada_yuuko@kurume-u.ac.jp）

講演番号：3C19p14
講演日時：3 月 19 日 17:35～ C 校舎 19 会場

# 酵母トリプトファン輸送体 Tat1 の分解における細胞質末端リン酸化の関与

# Cytoplasmic domain phosphorylation is involved in degradation of the yeast tryptophan permease Tat1

○望月 貴博、小幡 咲希子、阿部 文快（青山学院大理工）
○Takahiro MOCHIZUKI, Sakiko OBATA, Fumiyoshi ABE (Aoyama Gakuin Univ.)

【目的】 出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* におけるトリプトファンの取り込みは、トリプトファンに対する特異性の異なる 2 つの輸送体 Tat1 (低親和性) と Tat2 (高親和性) により担われ、いずれも様々なストレスに高い感受性を示す。Tat1 と Tat2 は Rsp5 ユビキチンリガーゼ依存的に分解されるが、Tat1 は非常に安定なタンパク質であり、定常状態の半減期は 6 時間程度である。私たちは、高圧条件 (25 MPa) やラパマイシン (200 ng/mL) に酵母細胞をさらすと Tat1 の分解が急速に進むことを見いだしている。しかしながらそのメカニズムは不明である。これまでに、αファクター受容体 Ste2 の分解には細胞質ドメインのリン酸化が重要であることが報告されている。そこで本研究では、Tat1 のリン酸化と分解との関係、およびどのようなキナーゼが Tat1 のリン酸化を担っているのかについて検討を行なった。

【方法】 野生型 Tat1 がリン酸化されているかどうか調べるため、3HA-Tat1 発現プラスミドを導入した野生株 BY4742 から膜画分を抽出後、脱リン酸化処理を行なった。その後、HA を標識とするウエスタンブロッティングを行なった。また SGD (*Saccharomyces* Genome Database) に登録されている Tat1 のリン酸化部位をアラニン、あるいはアスパラギン酸に置換した。変異型プラスミドを野生株に導入後、高圧条件下 (25 MPa, 3 時間) 、あるいはラパマイシン存在下 (200 ng/mL, 3 時間) で培養しウエスタンブロッティングを行なった。Tat1 のリン酸化を担うキナーゼを同定するため、様々なキナーゼの遺伝子破壊株に Tat1 発現プラスミドを導入し、ウエスタンブロッティングを行なった。

【結果】 膜画分を脱リン酸化処理したところ、3HA-Tat1 は低分子量側にバンドシフトした。このことは定常状態で Tat1 がリン酸化されていることを示唆する。Tat1 の既知リン酸化部位を全てアラニン ($Tat1^{STY>A}$) 、あるいはリン酸化を模倣したアスパラギン酸 ($Tat1^{STY>D}$) に置換し、Tat1 の分解を検証した。その結果、高圧条件下 (25 MPa) とラパマイシン存在下 (200 ng/mL) のいずれにおいても、$Tat1^{STY>A}$ の分解は抑制された。ところが、$Tat1^{STY>D}$ は野生型 Tat1 と同様に分解された。よって、リン酸化が Tat1 の分解を制御していることが示唆された。現在、Tat1 のキナーゼを同定するため、様々なキナーゼ遺伝子の破壊株に野生型 Tat1 を発現させ低分子量側へのバンドシフトを調べている。

tryptophan permease Tat1, ubiquitination, phosphorylation

講演番号：3C19p15
講演日時：3 月 19 日 17:50～ C 校舎 19 会場

Rsp5-Bul1 複合体を介した酵母トリプトファン輸送体 Tat2 の分解
Rsp5-Bul1 complex mediates degradation of the yeast tryptophan permease Tat2
○石井 凌賀[1]、天野 香織[1]、荒牧 真理[1]、野際 佳奈[1]、上村 聡志[2]、望月 貴博[1]、阿部 文快[1] ([1]青山学院大理工、[2]東北医科薬科医学)
○ Ryoga ISHII[1], Kaori AMANO[1], Mari ARAMAKI[1], Kana NOGIWA[1], Satoshi UEMURA[2], Takahiro MOCHIZUKI[1], Fumiyoshi ABE[1] ([1]Aoyama Gakuin Univ., [2]Tohoku Med and Pharm Univ.)

【目的】Tat2 は酵母の 12 回膜貫通型の細胞膜タンパク質で、高親和性トリプトファン輸送を担う。この輸送体は高水圧などのストレスによる損傷を受けやすく、トリプトファン要求株の増殖を制限する。しかし基質選択性や Tat2 分解機構の詳細には不明な点が多い。私たちは Tat2 の分解が Rsp5 ユビキチンリガーゼに依存すること、およびアダプタータンパク質 Bul1 を欠損すると分解が抑制されることを明らかにしている。しかしながら Tat2 の分解に不可欠な Bul1 のアミノ酸残基や、物理的相互作用の実体については明らかではなかった。こうした問題を明らかにするため、本研究では Split Ubiquitin System を用いた分子間相互作用の解析を行った。

【方法】Bul1 を介した Tat2 の分解機構を明らかにするため、アレスチンモチーフ（YGIG と YFF)、ユビキチン化部位（K558 と K578)、および Rsp5 との相互作用部位（PPSY）をそれぞれ変異させた Bul1 を野生株 YPH499 株に発現させ、ウエスタンブロットによって Tat2 の分解を調べた。また、各変異が Tat2 と Bul1 の相互作用にどのような影響を及ぼすのかについて、Split Ubiquitin System を用いた解析を行った。さらに Tat2 の分解を効率よく評価するため、ガラクトース誘導性のプロモーターを用いた実験系を構築した。

【結果】Bul1 のアレスチンモチーフや Rsp5 との相互作用部位に変異を導入すると、Tat2 の分解が顕著に遅延することがわかった。一方 Bul1 のユビキチン化部位については、変異の影響はあまり顕著ではなかった。Split Ubiquitin System を用いた解析により、これらの変異は Tat2 と Bul1 の相互作用を減弱させることが示唆された。また私たちは、低トリプトファン培地で培養した酵母に高濃度のトリプトファンを投与すると、Tat2 の分解が急速に進むことを見いだした。輸送基質による Tat2 の分解はチロシンやフェニルアラニン投与でも認められたが、ヒスチジンやスレオニン、ロイシン投与では認められなかった。このことは、アミノ酸輸送と Tat2 自身の分解に正の相関があることを示唆している。そこで現在、機能欠失を伴う変異型 Tat2 でも同様の解析を行い、輸送活性と Tat2 の分解にどのような関係があるのかを明らかにしようとしている。

Rsp5-Bul1, tryptophan permease Tat2, Split Ubiquitin System

講演番号：3C19p16
講演日時：3 月 19 日 18:05～ C 校舎 19 会場

出芽酵母の高圧増殖における SOD1 の役割
The role of SOD1 in growth of *Saccharomyces cerevisiae* under high pressure
○三ヶ尻 祐、阿部 文快（青山学院大理工）
○Yu MIKAJIRI, Fumiyoshi ABE (Aoyama Gakuin Univ.)

【背景と目的】圧力は深海を特徴づける環境因子である一方、私たちの日常生活では血圧や脳圧、また運動時の膝にかかる機械刺激としてその応答性に興味が注がれている。動物細胞では、数十 MPa の圧力がコラーゲンの発現やアポトーシスを引き起こす。酵母を用いてこれまで行ってきた網羅的遺伝子発現解析、および遺伝子破壊ライブラリーを用いた網羅的機能解析から、高圧条件と酸化的ストレスとの間に何らかの関係性があることが示唆された。好気性生物にとって活性酸素種（ROS）の発生は不可避であり、ヒトでは老化や疾患の原因にもなる。そこでまず、ROS 除去に関わる遺伝子の欠損が高圧増殖にどのような影響を及ぼすのかを調べた。特にスーパーオキシドディスムターゼ 1（SOD1）に着目した解析を行った。SOD1 は $O_2^{\cdot -}$の除去を担い、ヒトでの欠陥は筋萎縮性側索硬化症（ALS）やダウン症などの難病の発症にも関わっている。本研究では出芽酵母の高圧増殖における SOD1 の役割を明らかにすることで、高水圧が生体に与える影響を酸化的ストレスの視点から解明することを目的とした。

【方法と結果】生体内の ROS 分解経路に着目し、*SOD1* や *SOD2* をはじめとする種々の遺伝子欠損株を BY4742 株を親株とする遺伝子破壊ライブラリーから抽出した。それらを YPD 培地中で大気圧下、および 25 MPa の高圧条件下で培養した。その結果、*sod1*Δ株において野生型と比べ高圧増殖能の著しい低下が認められた。このことは、高圧下で細胞内に ROS が発生し、SOD1 がこれを除去することで高圧増殖を可能にすることを示唆している。また、*sod1*Δ株ほど顕著ではないが *sod 2*Δ株もやはり高圧感受性を示した。SOD1 は酵素として $O_2^{\cdot -}$を不均化することで $H_2O_2$ に変換する機能のほか、核転写因子のように働き、ストレス耐性や修復に関与する遺伝子発現を制御することが最近報告された。そこで現在、SOD1 の酵素活性部位のアミノ酸残基 His64 と Arg144、および核移行に必要なリン酸化部位 Ser60 と Ser99 をそれぞれアラニン置換し、それら変異型 SOD1 を *sod1*Δ株に発現させ高圧下における増殖能について調べている。

high-pressure growth, oxidative stress, SOD1

講演番号：3C20a01
講演日時：3 月 19 日 09:20～ C 校舎 20 会場

二形性真菌 *Mucor circinelloides* の形態変化による表現型スクリーニングの応用
Application on phenotypic screening by morphological change of *Mucor circinelloides*
○岩倉 遼、高野 真希、星野 一宏（富山大院理工）
○Ryo IWAKURA, Maki TAKANO, Kazuhiro HOSHINO (Univ. Toyama)

【目的】近年、新薬発見におけるスクリーニングでは標的分子を見つけ出すことが次第に困難になり、表現型スクリーニングが再び注目されている。表現型スクリーニングは、薬剤候補化合物を生物に添加し生物の形態変化を観察することによって、その化合物の効果を簡易的に分離しスクリーニングに応用する技術である。この技術では、環境変化に応答してその形態が変化する二形性真菌の活用が有効である。二形性真菌の形態変化は細胞内のシグナル応答、細胞膜合成や細胞骨格分子の生合成などに応答するため、天然由来の薬剤候補化合物の迅速な 1 次スクリーニングに利用可能と考えられる。二形性真菌とは、温度や pH、血清の有無などの様々な環境変化に応じて酵母体と糸状体の異なる 2 つの形態をとる真菌のことである。*Candida albicans* や *Coccidioides immitis* などの二形性真菌は酵母体から糸状体へ形態を変化させ、糸状体で病原性を示す。一方、接合菌 *Mucor* は炭素源や通気条件、環境変化によって酵母体および糸状体に形態が変化し、特に $CO_2$ が存在すると酵母体に形態変化する。このとき、アミノ酸類、Ergosterol 生合成阻害剤や細胞内 cAMP 調節物質が二形性変化に影響を与えていると報告されている。そこで本研究では、二形性真菌 *Mucor* を用いた天然物からの 1 次スクリーニング法の確立を目指し、各種化合物添加による PDE 阻害剤のスクリーニングへの応用を検討した。
【方法・結果】本研究では *Mucor circinelloides* NBRC4572J 株を使用した。4572J を 70%$N_2$+30%$CO_2$ の嫌気条件下で培養し酵母体とし、本培養に用いた。候補化合物(D,L-アミノ酸、コーヒー抽出物)を適当量添加した培地に 4572J の酵母体を植菌し好気条件で振とう培養を行い、培養 24 時間目に菌体を検鏡し形態の変化を確認した。遺伝子発現量の測定は、回収した菌体から RNA 抽出を行い、Real-time PCR を用いて cAMP の生合成に関与する酵素[Adenylate cyclase(AC), Phosphodiesterase(PDE) *etc.*]の遺伝子発現量を定量した。細胞内 cAMP 含量は GloMax®-Multi+ Detection System(Promega)で定量した。候補化合物である D,L-アミノ酸(33 種類)を添加した培地で 4572J を培養した結果、無添加の場合、培養 6 時間目に酵母体から菌糸が伸長し培養 24 時間目で糸状体へ変化した。しかし、各種アミノ酸添加が菌糸伸長に影響を与え一部酵母体が確認できた。特に、L-Arg、D-Met および D-Glu を添加した場合に酵母体が多く確認できた。また、コーヒー抽出物中に含まれる Caffeic acid も同様に酵母体を維持することが確認できた。二形性真菌 4572J の酵母体では、AC は高発現し、PDE の発現量は抑制されていたことから、酵母体を維持したアミノ酸や Caffeic acid は PDE 阻害物質である可能性が示唆された。現在、これら化合物添加時の細胞内 cAMP 含量および遺伝子発現量を検討中である。

*Mucor cirinelloides*, dimorphism, phenotypic screening

発表責任者：星野一宏（khoshino@eng.u-toyama.ac.jp）

講演番号：3C20a02
講演日時：3 月 19 日 09:35～ C 校舎 20 会場

*Streptomyces* 属放線菌における自然突然変異の発生と二次代謝を変調させる 23S rRNA 遺伝子変異の特性解析

Genetic and biochemical characterization of a 23S rRNA mutation that alters mutation frequency and perturbs secondary metabolism in *Streptomyces* spp.

○星野 颯[1]、今井 優[1,2]、濵渦 亮子[3]、越智 幸三[4]、保坂 毅[3]（[1]信大農、[2]ノースイースタン大、[3]信大先鋭領域融合研究群、[4]広工大生命）

○ Kanata HOSHINO[1], Yu IMAI[1,2], Ryoko HAMAUZU[3], Kozo OCHI[4], Takeshi HOSAKA[3]
([1]Shinshu Univ., [2]Northeastern Univ., [3]IBS-ICCER, Shinshu Univ., [4]Hiroshima Institute of Tech.)

**【背景・目的】**放線菌は抗生物質を筆頭に多くの有用二次代謝産物の生産者である。この十数年間の全ゲノム解析の結果から，放線菌は二次代謝産物生合成遺伝子を予想以上に多く持つことが判明した。しかし，通常の培養では，その大半が極低発現であるため，二次代謝産物の生産には至らないケースが多い。その実情から，潜在的二次代謝産物生合成遺伝子の活性化手法の確立と活性化メカニズムの理解は，放線菌からの新たな有用生理活性化合物を見つけ出す上で重要な課題とされている。

我々はこれまで，放線菌基準株 *Streptomyces coelicolor* A3(2) から色素抗生物質を高生産するエリスロマイシン（Ery）耐性変異株 SCE234 株を取得し，同変異株が 23S rRNA 遺伝子と *nsdA* (negatively affecting *Streptomyces* differentiation) 遺伝子に 1 箇所ずつ点変異を有することを明らかにした（それぞれ *rrnA*-23S rRNA-A2302T と *nsdA* T680G）[1]。本研究では，これらの変異の特性を明らかにし, SCE234 株における色素抗生物質高生産化（二次代謝活性化）の仕組みの解明を目的とした。

**【結果・考察】***S. coelicolor* A3(2) の親株に *nsdA* T680G 変異あるいは *rrnA*-23S rRNA-A2302T 変異を単独で導入した変異株を作製し，各変異が Ery 耐性と色素抗生物質生産に及ぼす影響を調べた。その結果，*nsdA* 変異は Ery 耐性とは無関係で，加えて，同変異単独では色素抗生物質高生産も起らないことが判った。一方, *rrnA* 変異については, Ery 耐性の付与に関わることが確認できたものの，同変異を導入すると色素抗生物質を高生産する菌株とそうではない菌株の 2 種類が出現してしまい，色素抗生物質生産への関与を明確に判断できなかった。この点を明らかにすべく，色素抗生物質の生産量が親株レベルの *rrnA* 変異株（SUIC-15）と色素抗生物質高生産 *rrnA* 変異株（SUIC-16）の全ゲノム解析を行ったところ，両 *rrnA* 変異株とも複数の変異を持つことが判明した。ここまでの結果から，*rrnA* 変異と他の変異の組み合わせ次第で色素抗生物質高生産が起こるものと推察された。すなわち，SCE234 株の色素抗生物質高生産は，*rrnA*-23S rRNA-A2302T 変異と *nsdA* T680G 変異が共存することで起きた。上述した *rrnA* 変異株の性質を踏まえ，さらに *rrnA* 変異の特性を詳細に調べたところ，興味深いことに, *rrnA* 変異が自然突然変異の発生率を高めることを新たに見出した。*rrnA* 変異のこの特異な作用が他の変異を呼び込み，それら変異の組み合わせ次第で色素抗生物質が高生産されることが判ってきた。現段階では，以上が放線菌での *rrnA* 変異による二次代謝活性化の基本原理と捉えている。現在, *rrnA* 変異が自然突然変異の発生率を高める仕組みについても詳細を解析中である。

**【文献】**[1] Imai, Y. *et al., J. Antibiot.*, 65:323-326(2012).

23S rRNA mutation, secondary metabolism, *Streptomyces*

発表責任者：保坂　毅（thosaka@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3C20a03
講演日時：3 月 19 日 09:50～ C 校舎 20 会場

# 接合伝達プラスミド pAMβ1 を用いた *Lactobacillus delbrueckii* 5 亜種の遺伝子操作法の検討

# The gene transduction into *Lactobacillus delbrueckii* 5 subspecies using conjugal plasmid pAMß1

○石崎 萌、岩本 大輝、佐々木 泰子 (明治大農)
○Megumi ISHIZAKI, Daiki IWAMOTO, Yasuko SASAKI (Meiji Univ)

【背景・目的】*Lactobacillus delbrueckii* 種には 5 亜種（subsp. *lactis*、subsp. *delbrueckii*、subsp. *indicus*、subsp. *sunkii*）が存在し、いずれもヨーグルトや漬物などの発酵食品の他に乳酸製造など産業的に有用であるが、染色体の改変技術は遅れている。特に *Lb. bulgaricus* は制限系が強く、二重鎖プラスミドの導入による遺伝子操作が困難である。また、*Lb. indicus*、*Lb. sunkii* は近年発見された亜種であり、これらに関する遺伝情報や研究例は殆どない。 pAMβ1 は多数の *Lactobacillus* 属において複製する広宿主域の接合伝達プラスミドであり、我々は当該プラスミドが、*Lb. delbrueckii* 3 亜種では複製されない事を利用して染色体への外来遺伝子導入を検討してきた[1)]。本研究では、pAMβ1 を用いてこれまで遺伝子導入の報告がない *Lb. indicus* 、 *Lb. sunkii* を含む *Lactobacillus delbrueckii* 5 亜種へ接合伝達を行ない、遺伝子導入・交換を試み、*Lb. delbrueckii* 種の染色体組込みベクターとしての pAMβ1 の有用性を検討した。

【方法】接合伝達プラスミド pβL-int2 は pAMβ1 に、外来遺伝子として *Streptococcus thermophilus* 由来の *l-ldh*（lactate dehydrogenase）を挿入し、また組込みおよび組換えを行う染色体相同領域配列として、*Lb. bulgaricus* 由来の *d-ldh*（lactate dehydrogenase）を用いた。大腸菌とのシャトル化を目指し pBR322 の ori を含んだ pGMβint では *Lb. delbrueckii* 由来の *d-ldh* を使用した。*Lb. bulgaricus*、*Lb. indicus* においては pβL-int2 を用いて、*Lb. delbrueckii*、*Lb. lactis*、*Lb. sunkii* においては pGMβint を用いて *Lb. delbrueckii* 5 亜種に接合伝達を行なった。

【結果・考察】*Lb. delbrueckii* 5 亜種のうち、*Lb. lactis* を除く 4 亜種において接合伝達体を取得した。接合伝達体は野生株では生産しない L-乳酸を生産し、外来遺伝子である *l-ldh* が発現していることを確認した。*Lb. bulgaricus* の遺伝子交換体は、*d-ldh* と *l-ldh* が交換され、L-乳酸を生産していたが、*d-ldh* を複数所持する株では微量の D-乳酸が検出された。*Lb. indicus* と *Lb. sunkii* においては染色体に組込まれずに pAMβ1 を複製していると考えられ、複製に関して亜種による相違が推定された。

1) Sasaki Y, et al. FEMS Microbiol Rev 12: P9（1993）

*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, pAMß1, conjugation

講演番号：3C20a04
講演日時：3 月 19 日 10:05～ C 校舎 20 会場

# ガラスビーズ法を応用したスラウストキトリッド類微生物への遺伝子導入

# Glass bead-based transformation method for Thraustochytrids microorganisms

○足立 匠[1,2]、佐原 健彦[2]、森田 直樹[1,2] ([1]北大院農・基礎環境微生物学、[2]産総研・生物プロセス)
○Takumi ADACHI[1,2], Takehiko SAHARA[2], Naoki MORITA[1,2] ([1]Grad. Sch. Agr., Hokkaido Univ., [2]BPRI, AIST)

【目的】海洋性真核微生物であるラビリンチュラ類は、ドコサヘキサエン酸（DHA）などの不飽和脂肪酸を多量に蓄積することを始めとし、スクワレン、アスタキサンチンといった有用物質の生合成能が注目されている。その生合成経路の解明や有用物質の発酵生産のための分子育種には、遺伝子の導入や破壊などの遺伝子操作技術が必要である。現在までに、エレクトロポレーション法や遺伝子銃法[1)]、またアグロバクテリウムによる感染を用いた形質転換法[2)]が報告されている。しかしながら現在研究が進んでいる株の中には、既存の方法では形質転換できない、あるいは形質転換効率が悪い株が多く存在している。*Aurantiochytrium limacinum* SR21 株（以下 SR21 株）と Thraustochytrid 類の 12B 株（以下 12B 株）は、非常に高い DHA 生産量が報告されているものの、現在までに形質転換株が確立されていない。そこで本研究では、既存の方法で形質転換が確認できなかったそれら２株をモデルとして、形質転換法の改良を検討した。
【方法・結果】SR21 株、12B 株を対象株とし、BY+0790 培地にて菌体を培養し、12B 株の EF-1α遺伝子のプロモーター及びターミネーターに G418 耐性遺伝子を接続した G418 耐性遺伝子カセットと 18S rRNA 配列とを導入したプラスミドを用いたエレクトロポレーション法による形質転換及び G418 耐性能による形質転換株のスクリーニングを試みた。また、G418 耐性遺伝子カセットを接続した pCAMBIA と *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 株を用いての形質転換についても検討した。しかし、いずれの株、方法でも形質転換株を得ることはできなかった。このとき、特にエレクトロポレーション法においては菌体の細胞壁が DNA 導入の障壁になっていると推測された。そこで、エレクトロポレーション法の前段階として、0.5㎜ のジルコニアビーズを菌体懸濁液に加えてボルテックス処理を施した。ビーズによって部分的に菌体表面を傷つけた細胞を用いてエレクトロポレーションを行ったところ、形質転換株を再現性良く得ることに成功した。また継代による G418 耐性の安定性、抽出ゲノムを用いた PCR により G418 耐性遺伝子カセットがゲノムに組み込まれていることを確認した。遺伝子を導入する際に細胞壁溶解酵素等で細胞壁を分解しプロトプラスト化することは広く行われているが、本法は酵素処理を用いた方法と比較し簡便であり、有用性が高いと思われる。

1) Sakaguchi et al., Appl. Environ. Microbiol. 78, 3193-3202 (2012)
2) Cheng et al., Microbiol. Res. 167, 179-186 (2012)

Thraustochytrids, transformation, glass bead method

講演番号：3C20a05
講演日時：3 月 19 日 10:20～ C 校舎 20 会場

# ゲノム合成を意識した溶菌法(CELyTED)の活用

# Application of CELyTED for Genome Project - Write (GP-Write)

○金子 真也[1]、中濱 みさ子[1]、板谷 光泰[2] ([1]東工大・生命理工、[2]慶應大・先端生命研)
○Shinya KANEKO[1], NAKAHAMA Misako[1], Mitsuhiro ITAYA[2] ([1]School of Life Sci. Tech. Tokyo Tech., [2]Inst. Adv. Biosci. Keio Univ.)

次世代シーケンサーの登場で塩基配列の解読は目覚ましい進歩を遂げ、いまやゲノムサイズの DNA を合成し、活用するゲノム合成研究が世界各国で始まった(1)。しかし DNA は長くなるほど物理的ダメージを受けやすく、ゲノムサイズの DNA はピペッティングを伴う *in vitro* 操作には適さない。そこで大腸菌、酵母、枯草菌を宿主とした *in vivo* でのゲノム合成法が報告されている。しかしながら合成されたゲノムを活用する手段についての報告は極めて少ない。本研究では自然界での水平伝播に習って、ゲノムサイズの DNA 取り扱い技術について紹介する。

水平伝播の形態の一つである「自然形質転換」では naked DNA が直接移動する。naked DNA は供与菌の生死を問わず、自然界に放出され、幅広い宿主間で移動することが報告されている。我々はこの点に着目し、大腸菌がλファージの感染で溶菌してもプラスミドは予想外に長期間安定して溶菌液中に存在することを利用した「溶菌法」(Cell Lysis Technology to provide transformable Extra-cellular DNA; CELyTED)を開発した(2)。CELyTED では、プラスミド DNA の *in vitro* での抽出・精製操作を必要としないために迅速かつ簡便で、精製過程でダメージを受けにくく、ゲノムサイズの DNA 調製法に適している(3)。本講演では CELyTED を適用したミトコンドリアゲノムの完全合成法を紹介する。

(1) Jef D et al.,(2016) *Science* 353, p.126-127
(2) 金子真也、板谷光泰 (2016) *化学と生物* 54, p.668-673
(3) Itaya M. and Kaneko S. (2010) *Nucleic Acids Research* 38: 2551-2557.

Synthetic genome, horizontal gene transfer, natural transformation

発表責任者：金子　真也（skaneko@bio.titech.ac.jp）

講演番号：3C20a06
講演日時：3 月 19 日 10:45～ C 校舎 20 会場

放線菌 *S. coelicolor*A3(2)の分泌タンパク質と二次代謝産物アクチノロージンとの菌体外相互作用の解析

The interaction between a secreted protein and actinorhodin derived from *Streptomyces coelicolor* A3(2)

○西山 辰也[1]、橋本 義輝[2]、高野 英晃[1]、上田 賢志[1]、小林 達彦[2] ([1]日大生資科・生命セ、[2]筑波大院・生命環境)

○Tatsuya NISHIYAMA[1], Yoshiteru HASHIMOTO[2], Hideaki TAKANO[1], Kenji UEDA[1], Michihiko KOBAYASHI[2] ([1]Nihon Univ., [2]Grad. School of Life and Environm. Sci., Univ. of Tsukuba)

【目的】以前の大会において講演者らは、放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)の生産する二次代謝産物アクチノロージン(ACT)がそれだけで（他にタンパク質を必要とせず）L-アスコルビン酸や L-システインの酸化反応を触媒する有機触媒であり、有機触媒が新たな生体触媒であることを報告した。本研究は、ACT の生体-有機触媒としての機能や生理学的意義を解明することで、二次代謝産物の触媒としての機能と役割に関する知見を収集することを目的とする。特にここでは、ACT と相互作用する細胞外タンパク質が存在することを示唆する結果が得られたことに基づき、そのタンパク質の同定ならびに ACT との相互作用に焦点を当てた解析を行った。

【方法】ACT の有機触媒としての機能解明の過程で、*S. coelicolor* A3(2)の培養上清画分をイオン交換カラムクロマトグラフィーに供したところ、ACT と常に挙動が一致するタンパク質を発見した。本タンパク質を同定するため、精製した溶出画分を SDS-PAGE に供し、ペプチドマスフィンガープリンティングによりタンパク質の同定を行った。更に得られたタンパク質から遺伝子を決定し、遺伝子クローニングを行い、目的タンパク質の大量発現系の構築を行った。この組換えタンパク質と精製した ACT を用いて相互作用解析を行うとともに、有機触媒-タンパク質複合体の触媒活性の変化等を調べた。

【結果】有機触媒として ACT は L-アスコルビン酸および L-システインを酸化する反応を触媒する。*S. coelicolor* A3(2)が ACT を培地中に分泌するために本触媒活性は培養上清中に見られるが、培養上清を透析しても活性は低下せず、一方で培養上清を熱処理すると失活したことから、ACT が熱に弱い巨大分子と相互作用していると考えられた。カラムクロマトグラフィーの結果から常に ACT と同じ溶出画分に存在するタンパク質を発見し、本タンパク質とその遺伝子を同定したところ、ACT 生合成クラスター中に存在するタンパク質であることが判明した。本タンパク質のアミノ酸配列中にはシグナル配列が存在するが、菌体外から回収された同タンパク質にはシグナル配列が欠失していたことから本タンパク質は菌体外に分泌されることが示された。さらに本タンパク質の遺伝子をクローニングし、得られた組換えタンパク質を用いて行った ACT との相互作用実験では、ACT と結合することでその触媒活性を安定に保持する機能を有することを示唆する結果が得られた。ACT-タンパク質複合体がもつ生理的役割は現在不明であるが、二次代謝産物とその特異的な結合タンパク質が細胞外で複合体を形成する事例は他に知られておらず、その生物学的意義に焦点を当てた研究は低分子リガンドとタンパク質の共進化の問題に対してもこれまでにない理解をもたらす可能性が期待される。

organocatalysts, secondary-metabolites

講演番号：3C20a07
講演日時：3 月 19 日 11:00～ C 校舎 20 会場

麹菌アルギニントランスポータの解析
Analysis of arginine transporter in *Aspergillus oryzae*.
○佐野 元昭、内田 麻瑚、中谷 貴人、松岡 晃史（金沢工大）
○Motoaki Sano, Mako Uchida, Takato Nakatani, Terufumi Matsuoka (KIT)

【目的】 麹菌（*Aspergillus oryzae*）は発酵産業に広く用いられる日本の国菌と呼ばれ、2005 年にゲノム解析が終了している。麹菌の遺伝子数は約 13,000 個で、多くの遺伝子は機能未知であり各研究機関が精力的に解析を行っている。今回、アミノ酸取り込みに関わるトランスポーターのうち、アルギニントランスポーターについて解析を行ったので報告する。

【方法と結果】 麹菌ゲノムデータベース上でトランスポーターと予測される遺伝子の中から、アルギニントランスポーターと推測される遺伝子2個を抽出した。これら遺伝子について、膜貫通領域を予測するSOSUI及びTMHMMにより膜貫通ドメイン数の解析を行った。その結果、膜貫通ドメイン数が11個と予測され、生体膜中に存在すると推測された。次に、*A. oryzae ligD*破壊株を宿主にして各々の遺伝子について破壊株の作製を行った。作製した破壊株で、アルギニンを単一窒素源とした培地で生育確認を行ったところ、顕著な生育不良が確認された。また、他の塩基性アミノ酸でも同様に生育不良が確認された。この結果から、今回抽出した遺伝子は、アルギニン等の取り込みに関わる重要な遺伝子であることが推測され、現在詳細な解析を進めている。

1) 佐野ら ：日本生物高分子学会2015年度大会

*Aspergillus oryzae*, transporter, arginine

講演番号：3C20a08
講演日時：3 月 19 日 11:15～ C 校舎 20 会場

# IL-1 ファミリーサイトカイン分泌乳酸菌の構築と評価

# Construction and evaluation of recombinant lactic acid bacteria secreating IL-1 family cytokine

○辻 光倭[1]、鈴木 駿也[1]、横田 健治[2]、五十君 靜信[2]、梶川 揚申[2]([1]東農大院・農化、[2]東農大・生応科)
○Kowa TSUJI[1], Shunya SUZUKI[1], Kenji YOKOYA[2], Shizunobu IGIMI[2], Akinobu KAJIKAWA[2]
([1]Biol. Chem,Tokyo Univ. Agr, [2]Dept. Appl. Biol. Chem,Tokyo Univ. Agr)

【背景・目的】

近年、乳酸菌を経口粘膜ワクチンの運搬体としての利用が試みられている。粘膜ワクチンは、従来の注射型ワクチンに比べ全身性免疫だけでなく粘膜局所での防御免疫も誘導し得るが、経口投与により十分な免疫応答を誘導することは容易でない。応用への課題として免疫誘導効率の改善が求められており、アジュバントとしてサイトカインの利用が検討されている。過去の研究により IL-1β を分泌する組換え *Lactobacillus acidophilus* (GAD19)におけるアジュバント効果が報告された。この中で IL-1β が IL-6 産生誘導を介した Th17 細胞の分化促進にも関与することが示唆された。一方、IL-1 ファミリーに属している IL-18 と IL-33 もアジュバント効果が報告されているが、それぞれ IFN-γ や IL-13 産生を促進することで IL-1β とは異なる Th 細胞誘導に関与すると考えられる。したがって、乳酸菌に異なる IL-1 ファミリーサイトカインを分泌させることで粘膜ワクチンのアジュバント効果に加え、抗原特異的 Th 細胞の分化極性をもコントロールできる可能性がある。そこで本研究では、IL-1 ファミリーサイトカイン分泌乳酸菌を構築し、それらの免疫学的特性について評価することを目的とした。

【方法・結果】

供試菌として *L. acidophilus* NCK2208 を用いた。乳酸菌用発現ベクターpTRK882 へコドンを適正化した人工 murine IL-18(mIL-18)又は murine IL-33(mIL-33)遺伝子を挿入した。これらのプラスミド(pTRK882::mIL-18 又は pTRK882::mIL-33)を *L. acidophilus* NCK2208 に導入し、得られた組換え *L. acidophilus* NCK2208/ pTRK882::mIL-18(PTL28)又は *L. acidophilus* NCK2208/ pTRK882::mIL-33 (PTL46)の培養上清中に分泌された IL-18 又は IL-33 をウエスタンブロットにより確認した。また炭酸バッファーを用いた pH コントロールにより、組換えサイトカイン産生量の増加も確認された。

得られた組換えサイトカインの生理活性を評価するため、マウス脾臓細胞に PTL28 と PTL46 の培養上清をそれぞれ添加し、培養した。その結果、IL-18、IL-33 共に生理活性が確認された。

現在、組換え *L. acidophilus* Th 細胞の分化への影響を評価するため、マウスパイエル板細胞を GAD19/PTL28/PTL46/ *L. acidophilus* NCK2208 /pTRK882(PTL53)と共培養し、RT-PCR 及びフローサイトメトリーによる Th 細胞応答の解析を行っている。

Lactic acid bacteria, IL-1 family cytokine, immune response

講演番号：3C20a09
講演日時：3 月 19 日 11:30～ C 校舎 20 会場

# 酢酸菌の免疫刺激作用に関与する菌体構成成分の探索

# Screening of cellular components involved in the immunostimulating properties of acetic acid bacteria

○五日市 悠[1]、柴崎 泰基[2]、横田 健治[2]、五十君 靜信[2]、梶川 揚申[2]([1]東農大院・農化、[2]東農大・生応科)
○ Yu ITSUKAICHI[1], Taiki SHIBASAKI[2], Kenji YOKOTA[2], Shizunobu IGIMI1[2], Akinobu KAJIKAWA[2] ([1]Biol. Chem,Tokyo Univ. Agr., [2]Dept. Appl. Biol. Chem,Tokyo Univ. Agr.)

【目的】
食品由来微生物の一部は、経口的に摂取することで宿主に保健効果を付与することが知られており、機能性食品への応用が進んでいる。特に乳酸菌においては、その免疫学的特性を利用した機能性食品の開発が進んでいる。酢酸菌も古来より食酢の醸造等に用いられ、様々な食品中からも分離される細菌であるが、その免疫学的機能の解析や応用研究は少ない。そこで本研究では、種々の酢酸菌について免疫学的機能を評価することを目的とした。
【方法・結果】
主に食品から分離された酢酸菌を用いて C3H/HeJ マウスの脾臓細胞を刺激し、培養上清中の IFN-γ を ELISA により定量した。その結果、*Kozakia baliensis* NBRC 16664$^T$ が最も強く IFN-γ を誘導した。この免疫応答に寄与する因子を調べるため、*K. baliensis* NBRC 16664$^T$ の菌体構成成分を分画した。菌体を超音波破砕で破砕し、遠心分離後得られた上清を水溶性画分とした。また、沈殿物は Bligh & Dyer 法を用いて脂質を抽出し、脂溶性画分を得た。各画分で C3H/HeJ マウスの脾臓細胞を刺激したところ、水溶性画分に IFN-γ 産生誘導能がみられた。次に、水溶性画分に対しプロテアーゼ処理または DNase 処理を行い、C3H/HeJ マウスの脾臓細胞を刺激した。培養上清中の IFN-γ を ELISA により定量したところ、いずれも酵素処理前と比較し反応の低下が見られたため、DNA 及びタンパク質の関与が示唆された。菌体から抽出した染色体 DNA を制限酵素処理し、DNA 断片を pUC18 に導入することでライブラリを構築した。クローン化した DNA 断片を用いて C3H/HeJ マウスの脾臓細胞を刺激し、IFN-γ 産生誘導能を評価した結果、DNA 断片ごとに IFN-γ 産生誘導能に差異がみられ、免疫刺激効果が塩基配列に依存していることが示唆された。
【考察】
*K. baliensis* NBRC 16664$^T$ から抽出された水溶性画分のプロテアーゼ処理または DNase 処理により、反応の低下がみられたことから、菌体構成成分のうち DNA 及びタンパク質の関与が示唆された。細菌の非メチル化 CpG DNA は TLR9 のリガンドとなることが知られており、*K. baliensis* NBRC 16664$^T$ の DNA クローンにおける IFN-γ 産生誘導能の差異は、非メチル化 CpG モチーフによる影響が考えられる。現在、CpG DNA による免疫刺激作用の検証を進めている。水溶性画分中のタンパク質については、免疫誘導に関与する分子の探索と同定を試みている。

acetic acid bacteria, *Kozakia baliensis*, IFN-γ

講演番号：3C20a10
講演日時：3 月 19 日 11:45～ C 校舎 20 会場

細菌べん毛モーターの新規阻害剤の探索
Search for inhibitors of the bacterial flagellar motor
○高橋 優嘉[1]、伊藤 政博[1,2] ([1] 東洋大・バイオ、[2] 東洋大・生命)
○Yuka TAKAHASHI[1], Masahiro ITO[1,2] ([1]Bio-Nano., Toyo Univ., [2]Life Sciences, Toyo Univ.)

多くの細菌は、らせん状の繊維からなるべん毛(flagellum)と呼ばれる運動器官を有する。このべん毛を回転させることで自由な遊泳を行っている。べん毛の構造は、大きく分けて膜に埋まったモーター部分に相当する基部体、推進力を得るスクリュー部分に相当するべん毛繊維、基部体とべん毛繊維をつなぐユニバーサルジョイントに相当するフックの 3 か所から構成される。これまでの研究から、べん毛モーターの構築や機能に約 50 の遺伝子が関与していることが報告されている。
べん毛の回転に必要な回転駆動力は、細胞膜に埋め込まれた基部体から供給される。このモーター部分に相当する基部体は、回転子と固定子によって構築されている。特に固定子はイオンチャネルとして機能し、エネルギー変換ユニットとして働いている。固定子の種類は、大腸菌やサルモネラ菌など多くの細菌が持つプロトン( $H^+$ )駆動型固定子 MotAB と海洋性 *Vibrio* 属細菌や *Bacillus* 属細菌が持つナトリウムイオン( $Na^+$ )駆動型固定子 PomAB、MotPS に分けられる。
これまでの研究から、細菌のバイオフィルム形成や病原菌の宿主へ感染と運動性が関連していること知られている。このことから、細菌の運動性阻害剤は、次世代の創薬ターゲットの一つといえる。本研究では、バイオフィルム形成能を指標とした細菌の新規運動阻害剤の探索を試みた。
細菌のべん毛モーターの阻害剤として、$H^+$駆動型モーターのプロトノフォアである Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP)、$Na^+$駆動型モーターのアミロイドと固定子のイオン流入経路に結合し阻害を引き起こす 3-amino-N-(aminoiminomethyl)-6-chloro-5-[ethyl(1-methylethyl)amino]-2-pyrazinecarboxamide (EIPA)が知れられている。また、べん毛モーターのエネルギー変換ユニットである固定子がイオンチャネルであることから本研究では、イオンチャネル結合化合物ライブラリーを用いてバイオフィルム形成能を阻害する化合物のスクリーニングを行った。詳細は口頭発表にて報告する。

biofilm, flagellar motor, inhibitor

講演番号：3C20p01
講演日時：3 月 19 日 14:00～ C 校舎 20 会場

脂肪滴膜リン脂質の脂肪酸不飽和度が脂肪滴膜タンパク質の局在移行に与える影響
The fatty acid desaturation of phospholipid monolayer affect the translocation of lipid droplet-associated protein

○有澤 琴子[1]、市 育代[2,3]、藤原 葉子[2,3] ([1]お茶大院・ライフ、[2]お茶大・基幹研究院、[3]お茶大・HLI 研)
○KOTOKO ARISAWA[1], IKUYO ICHI[2,3], YOKO FUJIWARA[2,3] ([1]Grad. Sch. Life Sci., Ochanomizu Univ., [2]Fac. Core Res., Ochanomizu Univ., [3]Inst. HU., Ochanomizu Univ.)

【背景・目的】
脂肪滴には脂肪蓄積に関連する複数の膜タンパク質が局在しており、脂肪滴の成熟段階に応じてその局在が変化することが知られている。また近年、脂肪滴表面の膜の脂質組成が脂肪滴膜タンパク質の局在に影響することが示唆されてきた。しかし、脂肪滴膜リン脂質の脂肪酸組成がタンパク質局在に及ぼす影響についての知見は乏しい。我々はこれまでに 3T3-L1 脂肪細胞を用いて、脂肪滴の成熟に伴い脂肪滴膜リン脂質の脂肪酸の不飽和度が変化することを明らかにした。本研究では、成熟脂肪滴に多く局在する膜タンパク質である Perilipin1（PLIN）の局在が、脂肪滴膜の脂肪酸組成によって調節される可能性を検討した。
【方法】
まず、PLIN の局在が脂肪滴膜リン脂質の脂肪酸組成により調節され得るかを調べるため、マウス PLIN 安定発現 NIH3T3 細胞に種々の脂肪酸を添加し、蛍光免疫染色にて PLIN を検出した。次に、膜表面のリン脂質不飽和度と PLIN の相互作用を詳細に検討するため、飽和脂肪酸のステアリン酸（C18:0）が結合したジステアリルホスファチジルコリン（DSPC）および不飽和脂肪酸のオレイン酸（C18:1n-9）が結合したジオレイルホスファチジルコリン（DOPC）を用いて試験管内で脂肪滴様の構造を持つエマルションを形成させ、エマルションへの PLIN の結合を Western blotting で評価した。また、PLIN とエマルションの結合が疎水性相互作用と静電気相互作用のどちらによるものかを調べるために octyl β-$_D$thioglucopyranoside または炭酸ナトリウムを添加し、タンパク質-エマルション脂質膜間の結合阻害を評価した。
【結果】
細胞を用いた PLIN 蛍光免疫染色の結果、飽和脂肪酸を添加した場合は PLIN が細胞質に分散して見られたのに対して、不飽和脂肪酸添加ではより脂肪滴へ局在していることが確認された。また、エマルションを用いた検討では、PLIN は不飽和脂肪酸モデルの DOPC を用いたエマルションに多く結合する傾向があった。さらに、静電気相互作用の阻害でより顕著に結合が阻害されたことから、PLIN とエマルションの結合には静電気相互作用が影響していることが示された。また、DSPC より DOPC の方が静電気相互作用阻害による結合の減少率は大きかったことから、脂肪滴膜リン脂質の脂肪酸組成の違いが、静電気相互作用を介した PLIN のエマルションへの結合能に影響することが示唆された。

lipid droplet, Perilipin1, phospho

発表責任者：有澤 琴子（ari.kotoko@gmail.com）

講演番号：3C20p02
講演日時：3 月 19 日 14:15～ C 校舎 20 会場

新規紡錘体形成経路の探索
Investigation of a novel mechanism for bipolar spindle formation
○湯川 格史[1,2]、岡崎 雅紀[1]、登田 隆[1,2] ([1]広島大・院先端研・分子生命、[2]広島大・健康長寿)
○Masashi YUKAWA[1,2], Masaki OKAZAKI[1], Takashi TODA[1,2] ([1]Dept. of Mol. Biotech., Grad. Sch. of Adv. Sci. Matt., Hiroshima Univ., [2]HiHA, Hiroshima Univ.)

染色体の均等分配には、有糸分裂期における紡錘体微小管の形成が必須であり、その双極性構造は微小管モーター蛋白質であるプラス端方向性 5 型キネシン（分裂酵母では Cut7）とマイナス端方向性 14 型キネシン（Pkl1）の拮抗作用によって形成維持されていると考えられている。多くの生物種において 5 型キネシンは生育に必須であり、欠損すると単極性紡錘体しか形成できない。しかし、驚くべき事に、分裂酵母の 5 型および 14 型キネシンを同時欠損させた *cut7pkl1* 二重欠損株は生育可能で、野生株と同様、双極性紡錘体を形成できることを見出した(1)。従って、*cut7pkl1* 二重欠損株では何らかの因子が Cut7 の代りに紡錘体形成に働くと考えられた。そこで、本研究では紡錘体形成に働く新たな因子の同定とその染色体分配における役割の解明を目的とした。目的因子は他のキネシンや微小管結合因子である可能性が高いと予想されたため、これらの因子の欠損と *cut7pkl1* 二重欠損の合成致死性を調べた。本発表ではこれまで知られていない新規紡錘体形成経路について報告したい。

1. Yukawa et al., *J. Cell Biol.*, 209:549-562. (2015)

bipolar spindle formation, kinesin motor, microtubule

講演番号：3C20p03
講演日時：3 月 19 日 14:30～ C 校舎 20 会場

液胞膜タンパク質の分解に必要なユビキチン化反応
Ubiquitination required for degradation of vacuolar membrane proteins
○中川 沙良、奥 公秀、阪井 康能（京大院農）
○Sara NAKAGAWA, Masahide OKU, Yasuyoshi SAKAI (Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【目的】真核生物において液胞（リソソーム）は、細胞質やオルガネラを取り込んで分解し、タンパク質、脂質、アミノ酸、金属など、細胞内リサイクリングに重要な役割を果たしているオルガネラである。その機能を維持するためには、多くのトランスポーターを初めとする膜貫通タンパク質が重要な機能を果たしているが、その量と質の制御に関与する分子機構には未解明の点が多い。私たちの研究グループは、液胞膜 V-ATPase の膜貫通サブユニットである Vph1 が、液胞膜そのものが陥入して細胞質を液胞内腔に取り込むミクロオートファジーにより分解されることを見いだした。さらにこの分解にエンドソームでの多胞体（multivesicular body）形成に必要な ESCRT タンパク質が必要であること、その中でも Vps27 が重要な働きをもつことを見出している。そこで本研究では、Vph1 のミクロオートファジー分解の分子機構を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】Vph1 の分解に必要な Vps27 がユビキチン結合部位を持っていることから、ユビキチン化酵素の Vph1 分解における機能を調べるために液胞膜に局在するユビキチン化酵素複合体サブユニットの各種欠損株を作成し Vph1 の分解について調べた。ミクロオートファジーによる Vph1 分解の生化学的な検出法として Vph1-GFP cleavage assay を用いた。本法は液胞膜に局在するタンパク質（Vph1）と GFP との融合タンパク質の分解量を、プロテアーゼ抵抗性の GFP タンパク質の残量により測定し、ミクロオートファジーの誘導条件の探索やその関連遺伝子の特定を行うことができる。その結果から液胞膜上ユビキチン化酵素サブユニット欠損株において分解の阻害が見られたため、その機能が Vph1 の分解に必要であることが示された。さらに、Vph1 分解に関与するユビキチン鎖の種類についても調べるために、プロテアソームでのタンパク分解に重要な K48,K63 残基をアルギニンに置換した変異型ユビキチン K48R または K63R 過剰発現株を用いて Vph1 の分解を調べた。その結果、両変異型ユビキチン過剰発現株で GFP-Vph1 分解が阻害されたため、Vph1 の分解に K48、K63 のポリユビキチン鎖形成が必要であると示唆された。

autophagy, yeast, vacuolar membrane

発表責任者：中川沙良（nakagawa.sara.64e@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3C20p04
講演日時：3 月 19 日 14:45～ C 校舎 20 会場

# $Ca^{2+}$流入の変動により制御されるアクチンの重合・エキソサイトーシス・菌糸の先端生長
# Oscillation of fungal tip growth is coordinated by pulsed $Ca^{2+}$ influx.

○竹下 典男[1,2]、Minoas Evangelinos[2]、Ling Lu[3]、Reinhard Fischer[2] ([1]筑波大生命環境、[2]カールスルーエ工科大、[3]南京師範大学)
○Norio TAKESHITA[1,2], Evangelinos Minoas[2], Lu Ling[3], Fischer Reinhard[2] ([1]Tsukuba Univ., [2]Karlsruhe Institute of Technology, [3]Nanjing Normal University)

糸状菌の細胞は、極性を菌糸の先端に維持することで先端生長を行うことから、細胞極性と形態形成に関わる基礎研究の材料として適している。また、糸状菌の動植物に対する病原性やその高い酵素分泌能は菌糸状の形態と密接に関連していることから、糸状菌の菌糸状の形態を支える先端成長の機構を理解することは、糸状菌が関わる動植物への病害防除、醸造・発酵、抗生物質・有用酵素生産などの諸産業に貢献する。

糸状菌の菌糸の先端生長のために必要な膜脂質やタンパク質は、菌糸先端への分泌小胞の輸送と先端でのエキソサイトーシスにより、先端の形質膜に供給される。菌糸先端への長距離の膜輸送には微小管が、先端でのエキソサイトーシスにはアクチンケーブルが、中心的な役割を担っている。これまでの研究により、糸状菌 *Aspergillus nidulans* において、これらの細胞骨格と極性マーカータンパク質が相互依存的に機能することで、極性部位の確立とエキソサイトーシスが段階的に起きることが示されている(1, 2)。実際に、菌糸の伸長速度が一定ではなく、増減の振幅が見られた。菌糸先端の F-アクチンと分泌小胞を、蛍光観察で経時的に測定した。また、$Ca^{2+}$の細胞内濃度を蛍光マーカーである R-GECO により可視化し、経時的に測定した。その結果、それぞれが同調した蛍光強度の振幅を示した。このことから、アクチンの重合とエキソサイトーシスが $Ca^{2+}$の流入により同調して制御されることで、一連の段階が協調的に進行する先端生長の動的機構が示唆された。

1. Ishitsuka Y, Savage N, Li Y, Bergs A, Grün N, Kohler D, Donnelly R, Nienhaus GU, Fischer R, Takeshita N. Super-resolution microscopy reveals a dynamic picture of cell polarity maintenance during directional growth. Science Advances (2015) 1, e1500947.
2. Takeshita N. Coordinated process of polarized growth in filamentous fungi. Biosci. Biotechnol. Biochem. (2016) 80, 1693-1699.

Aspergillus, cytoskeleton, exocytosis

発表責任者：竹下典男（takeshita.norio.gf@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3C20p05
講演日時：3 月 19 日 15:00～ C 校舎 20 会場

# 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* において初期エンドソーム動態は細胞の分化制御およびタンパク質分泌に関与する

# Early endosome motility is involved in cell differentiation and protein secretion in *Aspergillus oryzae*

○樋口 裕次郎、都甲 祐介、竹川 薫（九大農）
○Yujiro HIGUCHI, Yusuke TOGO, Kaoru TAKEGAWA (Kyushu Univ.)

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は我が国の発酵・醸造産業において古くから利用されてきた“国菌”であり、有用タンパク質の高い分泌能力を有する。近年、細胞内小胞輸送経路において、エンドサイトーシス経路のオルガネラである初期エンドソームもタンパク質分泌に関与することが示唆されてきた。初期エンドソームは広く真核生物において恒常的な動態を示し、糸状菌においてその動態の生理学的意義が明らかになってきている。初期エンドソーム動態は、微小管系モータータンパク質のキネシン及びダイニンによって制御されている。糸状菌細胞生物学のモデルである *Aspergillus nidulans* と *Ustilago maydis* において、初期エンドソームとモータータンパク質のリンカーとしてそれぞれ HookA と Hok1 が存在し、それらの遺伝子破壊株では初期エンドソーム動態の停止が報告されている。さらに、初期エンドソーム動態の停止がペルオキシソームといったその他のオルガネラの細胞内分布異常につながることも報告されている。そこで本研究では、黄麹菌における HookA 及び Hok1 のオルソログである AoHok1 の遺伝子破壊株を作製し、初期エンドソーム動態の生理学的な機能について解析した。

まず *Aohok1* 破壊株の生育解析を行ったところ、野生株に比べて生育が低下し、特に富栄養培地においてコロニー形態の顕著な異常が見られた。さらに、野生株に比べて分生子形成数の減少、一方で菌核形成数の増加が見られ、*Aohok1* 破壊株では分化制御に異常をきたしていることが示唆された。また、*Aohok1* 破壊株は野生株に比べて細胞壁ストレスに感受性を示すことがわかった。実際に、*Aohok1* 破壊株では初期エンドソームが停止しているかを確認するため、初期エンドソームマーカーの EGFP-AoRab5 を用いて解析を行った。その結果、野生株において観察される初期エンドソームの恒常的な動態が *Aohok1* 破壊株ではほぼ見られなかった。また、ペルオキシソームマーカーとして EGFP-SKL を用いてペルオキシソームの細胞内分布の解析を行ったところ、野生株では菌糸内でほぼ均一に分布するのに対し、*Aohok1* 破壊株では菌糸の先端部に蓄積している傾向が見られた。さらにタンパク質分泌経路に関して解析するために、ゴルジ体のマーカーとして EGFP-AoGos1、分泌小胞のマーカーとして EGFP-AoSnc1 をそれぞれ用いた。*Aohok1* 破壊株では、ゴルジ体の細胞内分布に顕著な異常は見られなかったのに対し、菌糸先端に見られる分泌小胞の集合体であるスピッツェンケルパーの分布に異常が見られた。そこでタンパク質分泌に異常があるかを解析したところ、培養後期において *Aohok1* 破壊株では野生株に比べて α-アミラーゼ活性の有意な低下が見られた。以上の結果から、初期エンドソーム動態は細胞の分化制御およびタンパク質分泌に関与することが示唆された。

early endosome, *Aspergillus oryzae*, secretion

発表責任者：樋口裕次郎（y.higuchi@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3C20p06
講演日時：3 月 19 日 15:25～ C 校舎 20 会場

# 黄麹菌のハイドロフォービン HypC の機能解析

# Characterization of hydrophobin HypC from *Aspergillus oryzae*

○廣木 寛之、石倉 幹大、朽方 康裕、中野 宏軌、中島 春紫 (明治大農)
○Tomoyuki HIROKI, Kandai ISHIKURA, Yasuhiro KUCHIKATA, Hiroki NAKANO, Harushi NAKAJIMA (Meiji Univ.)

＜緒言＞

ハイドロフォービンは糸状菌や担子菌が生産する両親媒性の低分子量タンパク質であり特徴的な配置の 8 つの Cys 残基を有する。単量体として分泌されたハイドロフォービンは細胞表層で強固な重合体を形成し、菌体に撥水性を付与する性質をもつ。また、テフロン板など主として疎水性基材表面へ強く吸着し、表面の「ぬれ性」を改変することなど物理化学的にユニークな性質を示す。一方、ハイドロフォービンの重合体は再解離が困難であり、精製及び解析が困難なタンパク質でもある。

筆者らは麹菌 *Aspergillus oryzae* から 4 つのハイドロフォービン(HypA-D)を単離し、HypA(151 アミノ酸)、HypB(146 アミノ酸)および HypD(207 アミノ酸)については発現条件や局在性、タンパク質の性質を明らかにしている。一方、HypC は全長 102 アミノ酸と麹菌のハイドロフォービンの中では最も分子量が低いうえに最も荷電アミノ酸の割合が低く、特異な性質と機能を有することが予想される。本研究では、*hypC* 遺伝子の発現特性および HypC タンパク質の性質について解析することを目的としている。

＜方法・結果＞

レポーター遺伝子としてβ-グルクロニダーゼ（GUS）を用い *hypC* 遺伝子の発現時期および発現条件の解析を行った。*hypC* 遺伝子の発現は分生子植菌後 48 hr がピークで、培養初期に培地中の水分量が多い条件で発現することを観察した。また、培地中の N 源の添加により発現が抑制されることも観察した。

次にヒストン 4 量体を構成する H2B と緑色蛍光タンパク質 eGFP との融合タンパク質を *hypC* 遺伝子プロモーター制御下で発現させる株を作製し、*hypC* 遺伝子が発現する細胞の核を可視化したところ、*hypC* 遺伝子は分生子・菌糸両部位で発現していることが明らかになった。また、HypC と eGFP との融合タンパク質を *hypC* 遺伝子プロモーター制御下で発現さたところ、HypC が菌糸および頂のうに局在することが観察された。

*Aspergillus oryzae*, hydrophobin, water content

発表責任者：中島　春紫（harushi@isc.meiji.ac.jp）

講演番号：3C20p07
講演日時：3 月 19 日 15:40～ C 校舎 20 会場

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* ハイドロフォービン群の吸着性に関する物性解析
Physical properties of hydrophobins from *Aspergillus oryzae*
○加瀬 明日香、中野 宏軌、廣木 寛之、中島 春紫（明治大農）
○Asuka KASE, Hiroki NAKANO, Tomoyuki HIROKI, Harushi NAKAJIMA (Meiji Univ.)

ハイドロフォービンは、糸状菌や担子菌が生産する低分子量の両親媒性タンパク質である。気中菌糸や分生子など気中構造の表層に自己集合して単層を形成し、菌体表面を覆うことにより撥水性を付与する機能を担っている。この撥水性は菌糸伸長や分生子分散性の向上、病原性真菌の宿主への感染性など、菌類の生態において重要な役割を果たしている。

ハイドロフォービンは特徴的に配置された 8 つの Cys 残基を有し、疎水性領域と親水性領域が明確な両親媒性を示す構造上の特性から天然の界面活性剤として働くことに加えて、液体 - 固体界面に自己集合する物性から、親水性や疎水性の種々の基材上に吸着させることも可能であり、基材表面の撥水性の意図的な改変が可能である。

我々は、清酒・醤油・味噌など日本の伝統的発酵食品の醸造微生物として古来より用いられてきた黄麹菌 *Aspergillus oryzae* より、ハイドロフォービンをコードしていると考えられる遺伝子 *hypA*、*hypB*、*hypC*、*hypD* を単離し、発現および機能について解析を行っている。一般にハイドロフォービンの相同性は非常に低く、同一菌株がもつ複数のハイドロフォービンでも相同性は 20 - 30%程度であるため、ハイドロフォービンごとに異なる物性をもつことが予想される。

*A. oryzae* のハイドロフォービン群においては、それぞれ発現条件や局在性など機能が異なることが明らかとなりつつあり、吸着性などの物性についても差異が観察されている。主として分生子表層に局在する特性をもつ HypA/RolA については大量生産・精製が可能となったことから物性解析を行った。精製 HypA/RolA 溶液を親水性または疎水性を示す各種基板上に滴下して乾燥させたところ、疎水性基板上には強固に吸着するが、親水性基板への吸着は確認されなかった。本来、ハイドロフォービンは親水的と考えられる菌体表層に局在することから、親水的な表面へハイドロフォービンが強固に吸着する機構について検討するため、細胞壁構成成分である β-1,3-グルカンやキチンなどの多糖類共存下での HypA の挙動と親水性基板上での HypA の吸着性について解析を行い、菌類由来の β-1,3-グルカンが HypA の吸着性に影響を与えることが示唆された。

*A. oryzae* のハイドロフォービンについても同様の解析を行い、物性の違いを検討している。

hydrophobin, *Aspergillus oryzae*, biosurfactant

発表責任者：中島　春紫（harushi@isc.meiji.ac.jp）

講演番号：3C20p08
講演日時：3 月 19 日 15:55～ C 校舎 20 会場

# ニコチンアミドによるユーグレナの鞭毛の特異的離脱反応の解析

# Specific Flagella Detatchment of of Euglena by Nicotinamide

大桑(林) 浩孝[1]、乾 博[2]、阪本 龍司[3]、○中野 長久[1] ([1]大阪府立大学地域連携研究機構 生物資源開発センター、[2]大阪府立大学大学院総合リハビリテーション学研究科、[3]大阪府立大学大学院生命環境科学研究科)

Hirotaka Ohkuwa-Hayashi[1], Hiroshi Inui[2], Tatsuji Sakamoto[3], ○Yoshihisa Nakano[1] ([1]Osaka Prefecture Univ. Center for Research, [2]Osaka Prefecture Univ. Graduate School of Comprehensive Rehabilitation, [3]Osaka Prefecture Univ.Graduate School of Life and Environmental Sciences)

ユーグレナの鞭毛は、高濃度カルシウム、低温や pH ショックなどのストレスによって離脱し、細胞が従来の楕円形から円形に変形すると報告されている。本研究においてははじめて、1 mM
ビタミン B 群ニコチンアミドによって特異的に鞭毛が離脱することを見出した。同時に同じ濃度のニコチンアミドの存在下では細胞分裂が抑制された。ところがニコチンアミドを除去すると細胞分裂が開始し、6 時間後には鞭毛が再生し、ユーグレノイド運動の開始が認められた。
さらにニコチンアミドによって離脱した鞭毛の再生について蛋白質レベルで検討したところ、離脱前と同じ鞭毛が再生することがわかった。ニコチンアミドによる鞭毛離脱と再生機構は葉緑体有無(光照射の条件)に影響されることも見出し、現在この現象について検討中である。

Euglena gracilis, nicotinamide, flagella

講演番号：3C20p09
講演日時：3 月 19 日 16:10～ C 校舎 20 会場

腸球菌ナトリウム輸送性 V-ATPase 膜内在性サブユニットの変異体解析
Mutagenesis of the $V_0$ subunit of *Enterococcus hirae* sodium translocating V-ATPase
○山地 有紀奈[1]、丸橋 優那[1]、大江 怜奈[1]、西谷 幸大[1]、関藤 孝之[1]、河田 美幸[1,2] ([1]愛媛大農、[2]愛媛大学術支援セ)
○Yukina Yamaji[1], Yuna Marubasi[1], Reina Ohe[1], Yukihiro Nisitasi[1], Takayuki Sekito[1], Miyuki Kawada[1,2] ([1]Facul. Agr., Ehime Univ., [2]ADRES, Ehime Univ.)

液胞型 ATPase (V-ATPase)は植物や真菌の液胞および動物細胞のリソソームなどのオルガネラ内部の酸性化に必須のプロトンポンプであり、出芽酵母では 14 種のタンパク質から構成されるマルチサブユニット酵素である。腸球菌 *Enterococcus hirae* の細胞膜に存在する V-ATPase は、プロトンではなくナトリウムおよびリチウムを基質とする点で特徴的な V-ATPase である。

本酵素における輸送イオンの結合部位は、膜内在性のローターリングを形成する NtpK サブユニット上のアミノ酸残基、L61, T64, Q65, Y68, Q110, E139 により構成され、これら 6 残基すべてが本酵素活性に重要である。特に第 4 膜貫通領域に存在する E139 残基は F-ATPase および V-ATPase のローターリングサブユニット間で保存された必須酸性アミノ酸残基であり、NtpK(E139D)変異型 V-ATPase は著しい活性低下を示す。また、細胞内外へのイオン輸送通路は NtpI サブユニットの膜貫通領域に存在し、R573 残基が NtpK の E139 残基と協同してイオン輸送に関わることが分かっているが、イオン輸送経路を形成するその他の重要アミノ酸残基については明らかになっていない。本研究では、V-ATPase によるイオン輸送メカニズムの解明を目的として、モデル酵素として腸球菌 V-ATPase を用い、膜内在性サブユニット NtpK リングおよび NtpI における重要アミノ酸残基の同定を試みた。

腸球菌において、アルカリ条件下、高ナトリウム（リチウム）濃度培地における生育には V-ATPase 活性が必須である。ランダムに変異を導入した *ntpK* もしくは *ntpI* 発現ベクターを NtpK もしくは NtpI 欠損株にそれぞれ導入し、アルカリ条件下、高ナトリウム（リチウム）濃度培地における生育を指標として、高ナトリウム（リチウム）感受性変異株をスクリーニングした。その結果、感受性亢進株の１つとして NtpK(E50D)変異体を単離した。E50 残基の変異によりアルカリ条件下高ナトリウム濃度培地における生育が抑制され、生細胞からのナトリウム排出活性が野生株の 50%程度に低下したことから、E50 残基はイオン輸送に関わる重要なアミノ酸残基であることが示唆された。

E50 残基は NtpK の第 1－第 2 膜貫通領域間ループに存在し、NtpK リングと回転軸を構成する NtpC サブユニットとの相互作用に関わると考えられる位置に存在することから、V-ATPase の複合体形成や酵素の回転反応に関与している可能性がある。

V-ATPase, sodium, vacuole

講演番号：3C20p10
講演日時：3 月 19 日 16:25～ C 校舎 20 会場

# 乳酸菌由来 S-layer タンパク質の免疫学的特性

Comparative analysis on immunological properties of S-layer proteins isolated from *Lactobacillus* strains.

○鈴木 駿也[1]、横田 健治[2]、五十君 靜信[2]、梶川 揚申[2] ([1]東農大院・農化、[2]東農大・生応科)
○Shunya SUZUKI[1], Kenji YOKOTA[2], Shizunobu IGIMI[2], Akinobu KAJIKAWA[2] ([1]Biol. Chem, Tokyo Univ. Agr, [2]Dept. Appl. Biol. Chem, Tokyo Univ. Agr)

【目的】S-layer タンパク質は一部の細菌や古細菌の細胞壁外層に多量に存在するタンパク質、又は糖タンパク質で、自己集合することで規則的な結晶構造（S-layer）を呈する。乳酸菌では *Lactobacillus* 属の少なくとも 13 菌種において S-layer タンパク質の存在が確認されているが、その機能については未解明な点が多い。過去の研究から、S-layer タンパク質の一部において免疫応答への関与が示唆された。しかし、乳酸菌の S-layer タンパク質は一次構造に多様性があり、それらの免疫学的機能に関する知見はほとんどない。そこで、本研究では異なる乳酸菌が持つ S-layer タンパク質を比較し、その免疫学的特性を評価することを目的とした。
【方法・結果】*Lactobacillus* 属細菌の S-layer タンパク質をアミノ酸配列のアライメント解析により比較した。その結果全体の相同性は 10～90%程度であり、特に N 末端領域において多様性がみられた。次に、*Lactobacillus* 属 8 菌種を供試菌とし、それらを 4MGu-HCl で処理し S-layer タンパク質を除去した菌体を調製した。また、供試菌から 5MLiCl を用いて S-layer タンパク質を精製した。Gu-HCl 処理菌体と未処理菌体、S-layer タンパク質の免疫学的特性を比較するため、それぞれでヒト単球由来 THP-1 細胞を刺激後、培養上清中のサイトカインを ELISA により定量した。その結果、Gu-HCl 処理菌体で未処理菌体と比較して IL-12 p40 産生誘導能が減少傾向にあり、S-layer タンパク質単体でも IL-12 p40 産生誘導能を確認した。また、S-layer タンパク質種間で IL-12 p40 産生誘導能に差異がみられ、*Lactobacillus amylolyticus* NRIC 0558$^{T}$ の S-layer タンパク質が高い IL-12 p40 産生誘導能を示した。続いて、S-layer タンパク質の免疫誘導に関わるドメインを探索するため、*L. amylolyticus* NRIC 0558$^{T}$ の S-layer タンパク質において組換え大腸菌を用いた His-tag 融合 S-layer タンパク質、キメラ S-layer タンパク質、断片化 S-layer タンパク質を精製した。精製した組換えタンパク質で THP-1 細胞を刺激後、培養上清中の IL-12 p40 を ELISA により定量したところ、N 末端領域を含むキメラ S-layer タンパク質で高い IL-12 p40 産生誘導能を確認した。
【考察】Gu-HCl 処理菌体では IL-12 p40 産生誘導能が減少傾向にあり、S-layer タンパク質単体でも IL-12 p40 の産生を誘導したため、S-layer タンパク質は菌体が示すサイトカイン産生誘導能に関与することが示唆された。また、S-layer タンパク質の IL-12 p40 誘導能は菌種間で大幅な差がみられ、*L. amylolyticus* NRIC 0558$^{T}$ の S-layer タンパク質においては、N 末端領域の立体構造が高いサイトカイン産生誘導に関与している可能性があった。

S-layer protein, immune response, lactic acid bacteria

講演番号：3C20p11
講演日時：3 月 19 日 16:50～ C 校舎 20 会場

Localization of 30S ribosomal protein S19 on the cell surface of *Lactobacillus rhamnosus* strains FSMM15 and FSMM22

○Niputudesy Aryantini[1], Daisuke Kondoh[1], Keita Nishiyama[2], Yuji Yamamoto[2], Takao Mukai[2], INengah Sujaya[3], Tadasu Urashima[1], Kenji Fukuda[1] ([1]Obihiro Univ., [2]Kitasato Univ., [3]Udayana Univ.)

[Background]

Cell surface proteins play a significant role in adhesion of probiotic bacteria to the host. In our previous study, *Lactobacillus rhamnosus* strain FSMM22 showed significantly higher binding ability to laminin, a component of the extracellular matrix, than another strain FSMM15. Further, 30S ribosomal proteins S19 (RpsS) was identified as a hypothetical laminin binding protein in 1 M lithium chloride extract prepared from bacterial cells of FSMM22. The aim of this study was to clarify the localization of RpsS on the cell surface of the FSMM strains.

[Materials and methods]

Anti-RpsS polyclonal antibodies were raised in rabbits using a chemically synthesized 19-amino-acid N-terminal sequence, MGRSLKKGPFADAHLLKKI, of RpsS of *L. rhamnosus* GG. The RpsS gene expression level was evaluated by real-time RT-PCR by gene amplification using specific primers and SYBR green reagent. The *gapdh* and 16s RNA genes were used as internal control genes. SDS-PAGE and Western blot analysis were performed to check the protein expression levels of RpsS on the bacterial cell surfaces and cytoplasm. The harvested bacterial cells were stained by 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride for microscopic observations.

[Results and discussion]

SDS-PAGE, Western blot, and microscopic analyses of the two FSMM strains revealed that RpsS was obviously detectable on the cell surface of FSMM22, but not on FSMM15. These observations suggested that the abundance of RpsS in *L. rhamnosus* was diverse in a strain dependent manner. On the other hand, there was no significant difference in RpsS mRNA expression levels in the FSMM strains, whereas RpsS was detectable only in the cytoplasm of FSMM22. Consequently, we assumed that RpsS might have unknown modifications in the N-terminal region in FSMM15 that hampered the binding of the primary antibodies in the Western blot analysis.

probiotics, ribosomal protein, host-microbe interaction

発表責任者：福田健二（fuku@obihiro.ac.jp）

講演番号：3C20p12
講演日時：3 月 19 日 17:05～ C 校舎 20 会場

# 大腸菌のペリプラズムプロテアーゼ BepA は、TPR domain を介した タンパク質間相互作用により外膜機能を維持する

# Periplasmic protease BepA functions to maintain cell envelope integrity through TPR domain-mediated interaction with outer membrane proteins in *Escherichia coli*

○大門 康志[1]、舛井 千草[1]、宮﨑 亮次[1]、櫻田 洋人[2]、田中 良樹[2]、鈴木 健裕[3]、堂前 直[3]、森 博幸[1]、塚崎 智也[2]、成田 新一郎[4]、秋山 芳展[1] ([1]京大ウイルス・再生研、[2]奈良先端大・バイオサイエンス、[3]理研・生命分子解析、[4]盛岡大・栄養科学)
○ Yasushi DAIMON[1], Chigusa MASUI[1], Ryoji MIYAZAKI[1], Hiroto SAKURADA[2], Yoshiki TANAKA[2], Takehiro SUZUKI[3], Naoshi DOHMAE[3], Hiroyuki MORI[1], Tomoya TSUKAZAKI[2], Shin-ichiro NARITA[4], Yoshinori AKIYAMA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]NAIST, [3]RIKEN, [4]Morioka Univ.)

大腸菌などのグラム陰性細菌の外膜外葉はLPS（リポ多糖）から構成され、化学物質等に対する透過障壁として働く。LPSは細胞質で合成され外膜へと輸送されるが、外膜への挿入は、β バレル型の外膜タンパク質LptDにより媒介される。細胞表層へのLPSの輸送が低下した大腸菌は外膜の透過性の亢進により有害物質や薬剤への感受性が高まるため、LptDは外膜の機能維持と細胞の生育に必須の働きを持つ。

大腸菌のBepA (YfgC)は、N末端側にM48 ファミリー亜鉛メタロペプチダーゼドメインを、C末端側に複数のテトラトリコ ペプチド リピート (TPR) モチーフを含むドメイン （TPRドメイン）を持つ。TPR モチーフは、細菌からヒトまで多くのタンパク質に存在しており、タンパク質間相互作用等に働くモジュールである。

我々はこれまでに、BepA が、LptD の成熟化（構造形成）や外膜へのアセンブリーを促進する分子シャペロン様機能と、正常なアセンブリーに失敗した LptD 等の分解除去を行うプロテアーゼとしての機能を併せ持ち、外膜の機能維持に重要な役割を果たすことを示した [1]。また、BepA は、β バレル型外膜タンパク質の外膜への組み込みに関わる BAM 複合体構成タンパク質とも相互作用し、その主要因子 BamA の分解に関与することも報告した。しかし、BepA が、如何にして LptD や BAM 因子と相互作用しているのか、TPR ドメインが BepA 機能にどのような役割を果たしているのかはよくわかっていなかった。

我々は、TPRドメインの機能について検討するために、TPRドメインの立体構造を X 線結晶構造解析により決定すると共に、このドメインをターゲットとして、網羅的な部位特異的 *in vivo* 光架橋実験を行い、多くの部位で架橋産物を検出した。これらの架橋産物の質量分析やイムノブロッティングによる解析から、TPRドメインが LptD や BAM 複合体の構成タンパク質と特定の位置で直接相互作用する事が強く示唆された。また、TPR ドメインの変異解析から、TPRドメインを介した LptD や BAM 複合体との相互作用が、BepA が機能するために重要であることを見出した。これらの結果を踏まえ、BepA TPRドメインの構造と機能について議論したい。

[1]Narita S., *et al.* 2013, PNAS 110, E3612-E3621

bacterial cell surface, outer membrane protein biogenesis, metalloprotease

発表責任者：秋山芳展（yakiyama@virus.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3C20p13
講演日時：3 月 19 日 17:20～ C 校舎 20 会場

# 複数のイオンを利用するべん毛モーター固定子 MotS の最小機能領
# Identification of the minimum functional region of *Bacillus alcalophilus* MotS that can use several ions..

○山本 まみ、田口 温子、伊藤 政博（東洋大院生命科学）
○Mami YAMAMOTO, Atsuko TAGUCHI, Masahiro ITO (Graduate School of Life Sciences, Toyo Univ.)

＜目的＞MotS は好アルカリ性細菌 *Bacillus alcalophilus* のべん毛モーターの固定子複合体を形成するタンパク質のひとつである。固定子はイオンチャンネルであると同時に駆動力回転ユニットとして機能する。これまで $Na^+$駆動型の固定子の解析は行われてきたが、複数のイオンを利用する新奇性の高い固定子を形成する *Bacillus alcalophilus* の MotS についてはその機構についての解析は進んでいない。そこで本研究では MotS の構造と機能の相関についての知見を得るために、固定子として機能する最小のタンパク質の領域を決定することを目的とした。
＜方法＞N 末端あるいは C 末端を段階的に欠失した MotS をコードする遺伝子断片を PCR により増幅し、MotS と複合体を形成する MotP をコードする遺伝子とともにベクターpBAD24 に連結した。作製したプラスミドは固定子 MotAB を欠失させた大腸菌 RP6894 株に導入した。導入した大腸菌を用いて遊走解析および遊泳解析を行った。また、免疫染色によって各種末端欠失型 MotS の発現量を解析した。
＜結果＞MotS の N 末端から 41 番から 85 番目および、236 番目から C 末端までのアミノ酸配列を欠失した MotSΔ85Δ236 は LB 軟寒天培地上で遊走し、顕微鏡下でも遊泳が認められた。一方、MotSΔ85 より N 末端側を欠失させた MotSΔ90、N 末端および C 末端側を欠失させた MotSΔ85Δ226 では遊走および遊泳は観察できなかった。これらの結果から MotS の最小領域は MotSΔ85Δ236 であることが分かった。大腸菌中での発現を確認するため、プラスミドを発現させた大腸菌より膜画分を調製した。SDS-電気泳動を行い、抗 MotS 抗体を用いた免疫染色を行った結果、運動性が見られなかった末端欠失型 MotS も大腸菌での発現は認められた。また、べん毛染色によってべん毛数を計測したところ、遊泳および遊走が観察できなかった MotSΔ90、MotSΔ85Δ226 を発現させた大腸菌と野生型 MotS を発現させた大腸菌ではべん毛数の違いは認められなかった。これらのことから MotSΔ85Δ236 は固定子として機能する最小のタンパク質であることが明らかになった。

flagellar motor, *Bacillus alcalophilus*, stator

講演番号：3C20p14
講演日時：3 月 19 日 17:35～ C 校舎 20 会場

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 外膜の有機炭素及び無機イオン透過性の解析
Outer membrane permeability of organic carbons and inorganic ions in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803
○木幡 光[1]、栃木 佐枝子[2]、高橋 秀幸[1]、児島 征司[1,2] ([1]東北大院・生命、[2]東北大・学際研)
○Hikaru KOWATA[1], Saeko TOCHIGI[2], Hideyuki TAKAHASHI[1], Seiji KOJIMA[1,2] ([1]Tohoku Univ. Graduate School of Life Sciences, [2]Tohoku Univ. FRIS)

**【背景】**グラム陰性細菌は一般的に、外膜の拡散チャネルを介して細胞外の糖やアミノ酸などの有機化合物を栄養源として取り込み利用する。一方、独立栄養生物であるシアノバクテリア（酸素発生型光合成細菌）は必ずしも細胞外の有機炭素を取り入れる必要はない。このため、シアノバクテリアの外膜はイオンなどの低分子無機物を透過できれば十分であり、他の従属栄養グラム陰性細菌と比べると外膜透過性は低いと予想されてきた。しかし、これまでにシアノバクテリア外膜の透過性が有機化合物を用いて実測された例はなく、イオンの透過を担う数種のチャネルの存在が知られていることを除けば外膜の物質透過に関する知見は極めて断片的である。本研究ではシアノバクテリアのモデル種の一つである *Synechocystis* sp. PCC 6803 （以下 PCC 6803 ）の外膜透過性を無機イオン、糖およびアミノ酸を用いて測定した。
**【方法と結果】**PCC 6803 の粗膜画分からショ糖密度勾配遠心により外膜を単離した。外膜画分および lithium dodecyl sulfate (LDS) を用いた可溶化外膜蛋白質画分をそれぞれリポソームに再構成し、リポソーム膨潤法 (Nikaido, 1981, J Gen Physiol) により糖とアミノ酸の透過性を測定した。その結果、両画分の透過性は大腸菌（グラム陰性細菌モデル）の外膜と比較して極めて低い（再構成蛋白質量あたりの透過性で 20 分の 1 以下）ことがわかった。一方で NaCl 等の無機イオンに対しては高い透過性を示したことから、PCC 6803 の外膜の物質透過は無機イオンに対して高透過性かつ糖・アミノ酸に対して低透過性という特性を示すことがわかった。単糖から四糖までの分子量の異なる糖分子の透過速度を基に糖・アミノ酸の透過を担う推定チャネル孔径を算出したところ、推定半径約 3 nm であった。PCC 6803 の主要外膜蛋白質を質量分析法により同定したところ、存在量の多い順に Slr1841, Slr1908, Slr0042, Sll1951, および Slr1270 であった。この中で Slr1841/1908/0042 は無機イオン透過性チャネルのホモログであり、Slr1270 はグラム陰性細菌に広く保存され、多様な生理活性物質の輸送に関与する孔径の大きな外膜チャネル蛋白質 TolC のホモログであった。Slr1270 を部分精製し透過性を測定した結果、糖・アミノ酸に対するチャネル活性は本画分に濃縮されることがわかった。一方で Slr1841/1908/0042 の部分精製画分は無機イオン透過性を保持していたことから、PCC 6803 の外膜においては高存在量の Slr1841/1908/0042 が無機イオンの透過を担い、低存在量の Slr1270 が有機化合物の透過を担うことが示唆された。本結果から、PCC6803 の外膜の物質透過特性は大腸菌等の一般的な従属栄養性グラム陰性細菌とは大きく異なっていることが明らかになった。

cyanobacteria, outer membrane permeability, channel

発表責任者：木幡　光（hkowata@ige.tohoku.ac.jp）

講演番号：3C23a01
講演日時：3 月 19 日 09:20～ C 校舎 23 会場

分泌性グルコアミラーゼ *STA1* 発現ビール酵母の接合育種
Construction of a brewing yeast expressing the glucoamylase gene *STA1* by mating
○川田 貴世、岩下 祐子、尾形 智夫 (前橋工科大学)
○Takayo Kawada, Yuko Iwashita, Tomoo Ogata (Maebashi Institute of Technology)

（目的）酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、マルトトリオースまで利用できるが、デキストリンは利用することができない。一方、*S. diastaticus* は、グルコアミラーゼ遺伝子 *STA1* を有しており、デキストリンを利用することができる。グルコアミラーゼを発現するビール酵母を接合育種することができれば、低カロリービールの製造が可能になると考えられる。一方、*STA1* 遺伝子は接合遺伝子座 *MAT* が a/αであると、抑制されることも報告されている。
（方法）上面ビール酵母由来 *S. cerevisiae* Y7 (*MAT*α)、あるいはパン酵母由来 *S. cerevisiae* MAFF113371 (*MAT*a)を、*S. cerevisiae* 278 (*MAT*α, *STA1*)と接合させ、*S. cerevisiae* Y7/278, *S. cerevisiae* 278/113371 を接合育種した。接合株は *MAT* 遺伝子座と *STA1* 遺伝子を PCR によって確認した。グルコアミラーゼ活性は、糖化力測定キットで測定した。発酵液中のマルトオリゴ糖は、HPLC によって測定した。香気成分はヘッドスペースガスクロマトグラフィーによって測定した。*MAT*αの発現は、*bar1* 変異の a 細胞の増殖阻害を阻止円形成で測定した。
（結果）接合育種した *S. cerevisiae* Y7/278 は、グルコアミラーゼ活性を有していなかった。一方、*S. cerevisiae* 278/113371 は、グルコアミラーゼ活性を有していた。後者の株を、モルトエキストラクト培地で培養した。グルコアミラーゼ発現株 *S. cerevisiae* 278/113371 の初期の発酵速度は、通常の下面ビール酵母 W34/70 に比べて遅かったが、発酵後期では、下面ビール酵母を上回っていた。産生されたエタノール量は、下面ビール酵母に比べて 15%増加していた。培地中のマルトオリゴ糖が 5 分の 1 以下になっていた。産生された酢酸エチル量は約 2.5 倍、イソアミルアルコール量は約 2.4 倍になった。この結果は、育種株では培地中のデキストリンが分解され、エタノールや香気成分になったと考えられ、新しいタイプのビールが生産できると期待された。*STA1* 発現株の初期の発酵速度が遅かったことは、デキストリンの分解によって生じたグルコースによるカタボライド抑制によるものと推察している。また、*MAT*α, *STA1* 株、*MAT*a/α, *STA1* 株について *MAT*α株のみ阻止円の形成が見られ、グルコアミラーゼ発現株の *MAT* 遺伝子座の制御は正常であると考えられ、*STA1* 遺伝子は *MAT*a/α であっても発現すると考えられた。一方、*S. cerevisiae* Y7/278 でグルコアミラーゼ活性がみられなかったことより、*STA1* 遺伝子発現には何らかの制御があるものと考えられた。本研究の一部は、食生活研究会平成 27 年度研究助成によるものである。

Brewing yeast, glucoamylase, mating

発表責任者：尾形智夫（tomoo.ogata@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：3C23a02
講演日時：3 月 19 日 09:35～ C 校舎 23 会場

# 圧力感受性ミトコンドリア供与による圧力感受性清酒酵母株の作出

# Isolation and characterization of barosensitive *Sake* yeast obtained by exchanging the barosensitive mitochondria

○野村 一樹、星野 浩史、田中 絵莉果、中島 加奈子、林 真由美、井口 晃徳、重松 亨（新潟薬大・応生科）
○ Kazuki NOMURA, Hirofumi HOSHINO, Erika TANAKA, Kanako NAKAJIMA, Mayumi HAYASHI, Akinori IGUCHI, Toru SHIGEMATSU (NUPALS)

【背景】 高圧技術とは、1,000 気圧 (100 MPa) 以上の非常に高い圧力 (高圧) により非熱的に微生物を殺菌する食品加工技術のひとつである。本技術は、従来の加熱に依存した食品加工技術と比較して、食品の新鮮な風味の保持、加熱による有用成分の劣化の抑制が期待できる。我々は、高圧処理により微生物の発酵を制御する (Pressure Regulated Fermentation; PReF) 技術の確立を目指している[1]。しかし、高圧装置コストは処理圧力レベルに比例するため、PReF 技術の確立には、従来の発酵微生物よりも低い圧力で不活性化する圧力感受性発酵微生物の作出が必要である。これまでに発酵微生物のひとつである出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* をモデルとして、ミトコンドリア機能不全が圧力感受性に強く相関することを明らかとした[2]。本研究では、機能不全 (圧力感受性) ミトコンドリアを清酒酵母株へ供与することで圧力感受性清酒酵母株を作出する技術を開発し、その株の増殖挙動および圧力不活性化挙動を評価した。
【方法・結果】 本研究では、実験室酵母株 *S. cerevisiae* KA31a 株から紫外線照射法により作出した圧力感受性変異株 *S. cerevisiae* a924E1 株 [*MATa, his3, leu2, trp1, ura3*] [3]および清酒酵母株 *S. cerevisiae* Sake yeast Kyokai No. 7 RIB No. 1003 株 [*MATa/α*] (RIB1003 株)、*S. cerevisiae* RIB No. 2006 K7 haploid 74 株 [*MATα*] (RIB2006 株) [4]を用いた。YPD 培地 (1% yeast extract, 2% peptone and 2% glucose) により定常期まで培養した a924E1 株および RIB2006 株培養液を新たな YPD 培地へ分注して 30°C, 24 h の条件で接合させ、位相差顕微鏡により接合子を観察した。栄養要求性の違いから最少培地 (0.67% yeast nitrogen base and 0.50 % glucose) を用いて接合処理株 1,350 株を作出した。ミトコンドリア機能を TTC 染色法により評価してミトコンドリア機能不全株 444 株を選抜した。*MAT* 遺伝子座を対象とした PCR 法による倍数性の評価および a924E1 株、RIB2006 株に対する接合能の評価により圧力感受性清酒酵母株として 20 株を選抜した。選抜した株を YPD 寒天培地に 4 回植え継いで純化し、再び TTC 染色法によりミトコンドリア機能を評価した。YPD 培地において増殖挙動を評価し、RIB1003 株と同等の増殖能を示した KE03 株を用いて、圧力不活性化挙動を解析した。その結果、清酒酵母株 RIB1003 株および RIB2006 株は、a924E1 株と比較して圧力耐性を示した。作出した圧力感受性清酒酵母株 KE03 株は、a924E1 株と同等の圧力感受性を示した。以上の結果から、任意の株へ圧力感受性を付与する作出技術が開発できた。本研究の成果は、PReF 技術の確立の大きな足掛かりになることが期待できる。本研究は、農研機構 生物系特定産業技術研究支援センターの「革新的技術開発・緊急展開事業 (地域戦略プロジェクト) 」により実施した。[1] Nomura and Iwahashi, Rev. Agri. Sci., 2014. [2] Nomura *et al.*, J. Food Sci., 2015. [3] Shigematsu *et al.*, J. Food Sci., 2010. [4] Katou *et al.*, Yeast, 2008.

high hydrostatic pressure, *Sake* yeast, mitochondria

発表責任者：野村 一樹（nomura@nupals.ac.jp）

講演番号：3C23a03
講演日時：3 月 19 日 09:50～ C 校舎 23 会場

協会系酵母とは系統が異なる清酒酵母のストレス応答とアルコール発酵能
Stress responses and alcohol fermentability of sake yeast *Saccharomyces cerevisiae* Km67 which is different genetic lineages of sake yeast *S. cerevisiae* Kyokai no. 7 group.
○高尾 佳史[1]、山田 翼[1]、五島 徹也[2]、冨本 和也[2]、赤尾 健[2]、末野 和男[1] ([1]菊正宗・総研、[2]酒類総研)
○Yoshifumi TAKAO[1], Tasuku YAMADA[1], Tetsuya GOSHIMA[2], Kazuya TOMIMOTO[2], Takeshi AKAO[2], Kazuo SUENO[1] ([1]Kiku-masamune, [2]NRIB)

【背景と目的】
現代の清酒醸造においては、その大半で日本醸造協会より頒布されている協会系酵母が使用されているが、自社の蔵など様々な場所から分離された酵母での醸造も広がりを見せている。協会系酵母は優れたエタノール発酵性を有しているが、この原因の一つはストレス応答欠損であり、そのためにストレス応答が弱いことが報告されている。そこで、菊正宗酒造（株）嘉宝蔵より分離され、今なお醸造に用いられている *Saccharomyces cerevisiae* Km67 株の醸造特性やストレス耐性を協会系酵母と比較したところ、15 ℃での小仕込みにおいて、Km67 株は協会系酵母と遜色ないエタノール発酵能を有し、協会系酵母と比べて醪末期でも死滅しにくいなど、エタノールストレスに強いことが明らかになった。さらに、Km67 株では協会系酵母で特徴的なストレス応答関連遺伝子の機能欠失変異がないこと、生成酒の成分には協会系酵母とは異なる特徴があることが分かった[1)]。そこで、Km67 株のエタノール発酵能やストレス耐性についてさらに詳しく調べることにした。
【方法と結果】
協会系酵母で機能欠失変異が見られる *RIM15*、*MSN4*、*PPT1* が関係するストレス応答が起きているかを調べるために、STRE（Stress response elements）-*lac*Z、HSE（Heat shock elements）-*lac*Z レポーターを X2180 株、Km67 株、K701 株に導入し、清酒醪中（留 7 日目）でのストレス応答を調べた。その結果 STRE、HSE ともに K701 株ではほとんどストレス応答が起きていなかったが、X2180 株と Km67 株ではストレス応答が確認された。さらに、清酒醪中での遺伝子発現をリアルタイム PCR で確認したところ、Km67 株では *RIM15*、*MSN4* の発現レベルが K701 株と同程度の低いものであった。Km67 株の高ストレス耐性は協会系酵母と異なり *RIM15* などが正常に働いていることによると予想していたが、他の要因によるものと考えられたため、遺伝子発現解析などによりその要因を調べている。一方、生成酒の親水性低分子化合物の網羅的解析を行った結果、Km67 株の生成酒では協会系酵母の生成酒と比較したときに特徴的な成分として Citramalic acid、Fructose、Turanose が検出された。これらの成分を清酒へ添加し、味認識装置での分析を行った結果、Citramalic acid を添加したものでは Km67 株の生成酒のプロファイルと似た傾向が見られたため、Citramalic acid は Km67 株の生成酒の味を特徴づける成分の一つである可能性があると考えられた。
1）高尾ら：日本農芸化学会 2016 年度大会講演要旨集 p. 2010

*Saccharomyces cerevisiae*, sake yeast, brewing characteristics

発表責任者：高尾佳史（y-takao@kikumasamune.co.jp）

講演番号：3C23a04
講演日時：3 月 19 日 10:05～ C 校舎 23 会場

実験室酵母変異株を用いたストレス感受性と清酒発酵力との関係の解析
Screening of stress-sensitive mutants of Saccharomyces cerevisiae and evaluation of their sake fermentation ability
○前田 岳彦、山田 美和、下飯 仁 (岩手大農)
○Takehiko Maeda, Miwa Yamada, Hitoshi Shimoi (Iwate Univ.)

【目的】
清酒酵母は出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に分類されるが、同種の他の菌株に比べて清酒もろみにおいて高濃度のエタノールを生産することが知られている。この高発酵力の原因について以前は、清酒酵母が他の菌株よりエタノールなどのストレスに耐性であるためであると考えられてきた。しかしその後の解析で、現在使用されているきょうかい 7 号系の清酒酵母にはストレス応答経路の遺伝子に多くの変異がありストレス感受性であるにもかかわらず、高発酵力を示すことがわかった[1, 2]。清酒酵母で変異があることが判明した *RIM15*、*MSN4*、*PPT1* などを破壊した実験室酵母は清酒発酵力が向上することが確認されたが、酵母のストレス応答にはこれら以外にも様々な経路が存在することが知られている。そこで、実験室酵母から多数のストレス感受性変異株を取得して清酒小仕込試験を行い、ストレス感受性が清酒発酵力にどのような影響があるのかを解析した。
【方法と結果】
一倍体の実験室酵母 X2180-1A に紫外線照射を行い、突然変異を誘発した。得られた約 10,000 個のコロニーのレプリカを作成し、55℃2 時間の熱ストレスでコロニーを形成しなくなった 115 株をストレス感受性候補株とした。取得株全てについてのスポットテストにより、55℃の熱ストレス感受性、22%エタノール感受性を評価した。増殖が高温感受性であるかどうかは 37℃での増殖により評価した。また、ストレス耐性と関連することが知られている細胞内グリコーゲン含量を YPD 平板倍地上のコロニーをヨウ素溶液で染色することで評価した。その結果、候補株のうち 74 株がストレス感受性株であると評価され、熱ストレス感受性とエタノール感受性には相関があった。総米 100 g 規模の清酒小仕込試験の結果、発酵力が親株よりも上昇している株は 115 株中の 32 株であった。以上の結果から、ストレス感受性変異が一般に発酵力を向上させるわけではないが、ストレス感受性変異株の一部は高い発酵力を示すことがわかった。
[1] H. Urbanczyk et al. J. Biosci. Bioeng. 112, 44-48 (2011)
[2] D. Watanabe et al. Appl. Environ. Microbiol. 78, 4008–4016 (2012)

Saccharomyces cerevisiae, stress-sensitive mutants, sake fermentation

発表責任者：下飯　仁（simoi@iwate-u.ac.jp）

講演番号：3C23a05
講演日時：3 月 19 日 10:20～ C 校舎 23 会場

# 清酒酵母によるガラクトース代謝能の解析

# Analysis of galactose metabolic in sake yeast

○小松原 芙未[1]、池永 裕[1]、佐藤 勝也[2]、鳴海 一成[3]、渡部 貴志[4]、増渕 隆[4]、林 秀謙[1] ([1]前工大院工、[2]量研機構、[3]東洋大生命、[4]群技セ)
○Fumi Komatsubara[1], Hiroshi Ikenaga[1], Katsuya Satoh[2], Issay Narumi[3], Takashi Watanabe[4], Takashi Masubuchi[4], Hidenori Hayashi[1] ([1]Maebashi Inst. Technol., [2]QST, [3]Toyo Univ, [4]Gunma Industrial Technology Center)

【背景・目的】清酒酵母である協会 901 号（K901）は、ガラクトースの代謝ができない。しかし、K901 を親株として群馬県が開発した群馬 KAZE 酵母（カプロン酸エチル高生産株）はガラクトース代謝能を有している。その原因を調べるために、群馬 KAZE 酵母のガラクトース代謝系制御遺伝子である *GAL3*、*GAL4*、*GAL80* の塩基配列解析を行った所、片方の染色体の *GAL4* に復帰変異があることが明らかになり、その影響でガラクトース代謝能を獲得したと考えられた。さらに、K901 の *GAL4* は両方の染色体に 2 塩基の欠損変異を持っているため、*GAL4* が機能しないことが判明した。本研究では、K901 に KAZE 正常型 *GAL4* を挿入しガラクトース代謝能が復帰するのか否かを解析することを目的とする。また、群馬 KAZE 酵母は片方の染色体の *GAL4* に 2 塩基の欠損変異があることが判明したので、他の実用醸造酵母の *GAL4* の変異の有無の解析を行った。
【方法】KAZE 正常型 *GAL4* を連結した発現ベクターを用いて、K901 を形質転換し、ガラクトース代謝能の測定を行った。ガラクトース代謝能の有無は、培地中のガラクトース残量とその時の生菌数を測定した。また、KAZE 正常型 *GAL4* 導入 K901 をガラクトースまたはグルコースを含む培地で 24 時間培養を行い、菌体より RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を作製し、リアルタイム PCR 法を用いて、ガラクトース代謝関連遺伝子（*GAL1*、*GAL2*、*GAL4*、*GAL7*）の発現量を測定した。さらに、他の実用醸造酵母（29 株）の *GAL4* の塩基配列の決定を行い、変異の有無の解析を行った。これらの菌株についてはガラクトースを含む培地で培養を行い、ガラクトース代謝能を有しているかどうか解析した。
【結果及び考察】ガラクトース代謝能測定の結果は、KAZE 正常型 *GAL4* 導入 K901 のガラクトース残量は 5%まで減少し、代謝能を有していた。K901 のガラクトース残量は初期量から減っていなかった。生菌数は、KAZE 正常型 *GAL4* 導入 K901 では、約 $10^9$ CFU/ml、K901 は約 $10^7$ CFU /ml だった。このように正常型の *GAL4* を持つ株とそうでない株の間に、生菌数の差が見られた。また、ガラクトース代謝関連遺伝子の発現量については、K901 と比較して KAZE 正常型 *GAL4* 導入 K901 の方が高い傾向にあった。他の醸造用酵母については、群馬 KAZE 酵母の *GAL4* のように一方が正常である酵母は 13 株、両方の染色体が正常である株が 12 株で、共にガラクトース代謝能を有していた。K901 の *GAL4* のように欠損変異を持つ菌株は 4 株あり、ガラクトースを代謝しなかった。これらの結果から、群馬 KAZE 酵母における *GAL4* の復帰変異がガラクトース代謝能を回復させた原因であるといえる。

Saccharomyces cerevisiae, sake yeast, Gal4

講演番号：3C23a06
講演日時：3 月 19 日 10:45～ C 校舎 23 会場

清酒酵母きょうかい 7 号から得られた一倍体では染色体組換えが生じていない
Chromosome recombination deficiency in meiotic segregants of sake yeast K7
○花角 優太[1]、清水 頌平[2,3]、鈴木 太郎[2,3]、赤尾 健[3]、山田 美和[1]、下飯 仁[1,2,3] ([1]岩手大・農、[2]広島大院・先端研、[3]酒総研)
○Yuta HANAZUMI[1], Shohei SHIMIZU[2,3], Taro SUZUKI[2,3], Takeshi AKAO[3], Miwa YAMADA[1], Hitoshi SHIMOI[1,2,3] ([1]Iwate Univ., [2]Hiroshima Univ., [3]NRIB)

【目的】
清酒醸造に用いられている清酒酵母は胞子形成率が低く、胞子が得られた場合でも発芽率が非常に低い。我々は、清酒酵母きょうかい 7 号（K7）から取得した一倍体が異数体を含んでいることから[1]、清酒酵母は減数分裂時の染色体組換えに欠陥があり、その結果の染色体不分離によって胞子形成率や発芽率が低下するのではないかと考えた。今回は、K7 の 3 番および 8 番染色体にそれぞれ 2 箇所あるヘテロザイゴシティー間の分離を 100 株の K7 一倍体について調べた。また、K7 一倍体 4 株のゲノム DNA を次世代シーケンサーでリシーケンスし、ゲノムワイドな染色体組換えを観察した。
【方法】
以前取得した 100 株の K7 一倍体[2]からゲノム DNA を抽出し、ヘテロザイゴシティーを含む領域を PCR で増幅し、DNA シーケンスを行った。一倍体の次世代シーケンサーによるリシーケンスにはイルミナ社の HiSeq2500 を用いた。得られたリードを DDBJ Read Annotation Pipeline を用いて K7 ゲノムにマッピングした後、K7 ゲノムでヘテロザイゴシティーを示す部分の塩基を抽出し、菌株間で比較した。
【結果】
同一染色体上の 2 箇所のヘテロザイゴシティーについて減数分裂時の染色体組換えが正常であれば、一倍体で 4 種類のハプロタイプの存在が予想される。しかし実際には、100 株の内ヘテロザイゴシティーに由来する塩基を決定できた一倍体で 2 種類のハプロタイプしか観察されなかった。また、4 株の一倍体のゲノムリシーケンス解析においても、ヘテロザイゴシティーに由来する塩基のハプロタイプは各染色体において 2 種類または 1 種類しか観察されず、組換え型と考えられるハプロタイプは観察されなかった。以上の結果は、K7 では減数分裂時の染色体組換えが生じていないことを示している。現在は、同一染色体上に 2 種類の遺伝子マーカーを導入した二倍体清酒酵母を作成して、減数分裂時の組換えを検証している。
[1] T. Katou et al. J. Biosci. Bioeng., 107, 383-393 (2009)
[2] T. Katou et al. Yeast, 25, 799–807 (2008)

sake yeast, chromosome recombination, genome sequencing

講演番号：3C23a07
講演日時：3 月 19 日 11:00～ C 校舎 23 会場

# 老香前駆物質を生成しにくい清酒酵母の育種

# Screening of sake yeast with low productivity of dimethyl trisulfide precursor

○若林 興[1]、井上 豊久[1]、池田 優理子[2]、神田 涼子[2]、磯谷 敦子[2]、藤井 力[2]、中江 貴司[1]([1]日本盛、[2]酒総研)
○Kou WAKABAYASHI[1], Toyohisa INOUE[1], Yuriko IKEDA[2], Ryoko KANDA[2], Atsuko ISOGAI[2], Tsutomu FUJII[2], Takashi NAKAE[1] ([1]Nihonsakari Co., Ltd., [2]National Research Institute of Brewing)

【背景・目的】ジメチルトリスルフィド(DMTS)は清酒の貯蔵劣化臭である老香の主要成分である。DMTS の生成を抑制することができれば、清酒の品質安定性の向上が期待できる。 酒類総合研究所では清酒における DMTS の主要な前駆物質として 1,2-dihydroxy-5-(methylsulfinyl) pentan-3-one (DMTS-P1)を同定するとともに、DMTS-P1 の生成に酵母のメチオニン再生経路が関係すること、メチオニン再生経路の遺伝子である *MRI1, MDE1* のいずれかを破壊した株を用いることで清酒中の DMTS-P1 及び DMTS 生成ポテンシャル（清酒を 70℃で 7 日間貯蔵後の DMTS 量）が顕著に減少することを明らかにしてきた。 しかし、遺伝子組換体を使用した清酒の産業利用には課題が多く、現実的ではない。そこで突然変異による *mri1, mde1* 変異株の取得法の確立と、老香前駆物質低生産酵母の取得を目的として研究を行った。
【方法・結果】メチオニン再生経路の代謝中間体である 5'-methylthioadenosine (MTA)を利用したネガティブセレクションについて検討した。 MTA はメチオニン再生経路のうち *S*-adenosylmethionine (SAM)の代謝により生じる中間体で、Mri1p や Mde1p による反応は MTA をメチオニンに再生する経路の途中にある。 つまり、メチオニン要求性変異株を使用し、メチオニンのかわりに MTA を加えた培地を用いれば、MTA より下流の代謝に関する酵素遺伝子の変異株は生育することができなくなると考えた。 この仮説を実証するため、清酒酵母協会 701 号(K701)の一倍体株よりメチオニン要求性変異株を取得し、その株から*Δmri1* 株を作製、親株と破壊株で増殖に差がでるかどうか確認した。両株を、メチオニンの代わりに MTA を含む最少培地で培養し、増殖を比較したところ、親株と破壊株の差はわずかで、スクリーニングに使用できるほどの差にはならなかった。 そこで我々は両株の増殖に差がでる培地の組成を検討したところ、親株と*Δmri1* 株の増殖差が大きくなる条件を見出すことができた。見出した組成の培地を用い、K701 一倍体のメチオニン要求性変異株を親株として変異株のスクリーニングを試みたところ、スクリーニング培地で増殖できない変異候補株を複数取得できた。 また、そのうち 3 株の DMTS-P1 生成能が親株に比べ顕著に低下していることがわかった。 これらの株の *MRI1* 遺伝子や *MDE1* 遺伝子の配列を調べたところ、*MRI1* 遺伝子に変異が入っている株が 1 株、*MDE1* 遺伝子に変異が入っている株が 1 株含まれており、本スクリーニング法が *mri1, mde1* 変異株の取得に有効であることが明らかとなった。

dimethyl trisulfide, sake yeast, methionine salvage pathway

講演番号：3C23a08
講演日時：3 月 19 日 11:15～ C 校舎 23 会場

セルフクローニング法による清酒酵母の老香関連遺伝子 *MRI1* 変異株の作製
Construction of sake yeast with mutated *MRI1* gene using self-cloning method
○宇原 諒[1,2]、池田 優理子[2]、若林 興[3]、井上 豊久[3]、中江 貴司[3]、磯谷 敦子[2]、藤井 力[1,2] ([1]広島大院・生物圏、[2]酒総研、[3]日本盛)
○Ryo UHARA[1,2], Yuriko IKEDA[2], Kou WAKABAYASHI[3], Toyohisa INOUE[3], Takashi NAKAE[3], Atsuko ISOGAI[2], Tsutomu FUJII[1,2] ([1]Hiroshima Univ., [2]NRIB, [3]Nihonsakari Co., Ltd)

【背景・目的】前演者は、清酒酵母一倍体のメチオニン要求性株を親株としたスクリーニングにより 1,2-dihydroxy-5-(methylsulfinyl) pentan-3-one (DMTS-P1)生成能が顕著に低下した変異株 3 株を取得し、そのうち 1 株の *MRI1* 遺伝子に変異が入っていることを見出した。我々は、一昨年の本大会にて、マーカー除去型ベクターpAUR135 を用い *MRI1* 遺伝子にストップコドンをホモに導入することで DMTS-P1 生成能が顕著に低下した株を育種、醸造特性や製成酒の一般成分値には大きな違いがないが、育種株による製成酒の dimethyl trisulfide (DMTS)生成ポテンシャル（清酒を 70℃で 7 日間貯蔵後の DMTS 濃度）が顕著に低下することを示した[1)]。そこで本研究では pAUR135 を用いたセルフクローニング法により前演者の取得した変異株の変異型 *MRI1* 配列を清酒酵母に導入し、変異型 *MRI1* 配列だけで清酒酵母が DMTS-P1 低生成能を示すか確認するとともに、変異株の変異型 *MRI1* 配列を利用した優良清酒酵母の育種を目標とした。なお、食品衛生法では、導入配列が自然界に存在する配列の場合、遺伝子組換え体とみなされず、組換え体を使用した食品に課される安全性審査の対象外となる。
【方法・結果】DMTS-P1 低生成能を示した変異株の変異型 *MRI1* 配列を PCR で増幅し、pAUR135 に組み込んで用いた。pAUR135 はオーレオバシジン耐性遺伝子とガラクトース誘導性増殖阻害配列を持つ。清酒酵母 K901 に形質転換して取得したオーレオバシジン耐性株から相同組換えによりベクター配列が抜けガラクトース培地で増殖できるようになった株を選択、コロニーPCR 及び DNA シークエンスにより *MRI1* 遺伝子にヘテロで変異が導入されたことを確認した。同じ操作を繰り返し、*MRI1* 遺伝子にホモで変異が導入された株を得た。DMTS-P1 生成能を確認したところ、ホモ変異株では親株より DMTS-P1 生成能が顕著に低下しており、前演者の変異株の DMTS-P1 低生産能は *MRI1* 遺伝子の変異だけで説明ができることが分かった。総米 300 g の小仕込み試験を行ったところ、ホモ変異株は親株より製成酒中の DMTS-P1 濃度及び DMTS 生成ポテンシャルは顕著に低下していたが、発酵経過や製成酒の一般成分値には大きな差は見られなかった。これらの結果から、自然界に存在する変異型 *MRI1* 配列を利用したセルフクローニング法により優良清酒酵母の育種が可能であることが明らかになった。

1) 池田 優理子ら、日本農芸化学会 2015 年度大会（岡山）、講演番号 3A21p07 (2015)

dimethyl trisulfide, sake yeast, self-cloning

講演番号：3C23a09
講演日時：3 月 19 日 11:30～ C 校舎 23 会場

# セルフクローニング法による清酒酵母の老香関連遺伝子 *MRI1* 完全欠失株の作製

# Construction of sake yeast with complete deletion of *MRI1* gene using self-cloning method

○池田 優理子[1]、森吉 雄太[1,2]、神田 涼子[1]、磯谷 敦子[1,2]、藤井 力[1] ([1]酒総研、[2]広島大院・先端研)
○Yuriko IKEDA[1], Yuta MORIYOSHI[1,2], Ryoko KANDA[1], Atsuko ISOGAI[1,2], Tsutomu FUJII[1] ([1]Natl. Res. Inst. Brewing, [2]AdSM, Hiroshima Univ.)

【背景・目的】ジメチルトリスルフィド（DMTS）は清酒の貯蔵劣化臭である老香の主要成分で、その主要前駆物質である 1,2-dihydroxy-5-(methylsulfinyl) pentan-3-one（DMTS-P1）の生成には、清酒酵母のメチオニン再生経路遺伝子である *MRI1* もしくは *MDE1* が関与する。一昨年の本大会で、セルフクローニング法により *MRI1* に 1 塩基置換によるストップコドンを導入した株（*MRI1*-SC 株）と、抗生物質耐性遺伝子で *MRI1* ORF を置換した *MRI1* 破壊株（K901-*mri1Δ*）を作製し、いずれの株も醸造特性は親株と変わらないが、製成酒の DMTS-P1 濃度および DMTS 生成ポテンシャル（清酒を 70℃で 7 日間貯蔵後の DMTS 濃度）が大幅に低減することを報告した。しかし、自然界に存在しない変異を導入したセルフクローニング株や遺伝子組換え株の産業利用化には課題が多い。そこで本研究では、より実用化の可能性の高い DMTS 前駆物質低生産性清酒酵母の育種を目的として、清酒酵母の *MRI1* ORF をセルフクローニング法により完全欠失させた株を作製し、その醸造特性について検討した。
【方法】セルフクローニング法による *MRI1* ORF の完全欠失株（*MRI1*-SC-D 株）の作製は、清酒酵母きょうかい 901 号（K901）を親株にして行った。マーカー除去型ベクターpAUR135 に *MRI1* ORF の上下流配列を挿入した完全欠失ベクターを作製し、酢酸リチウム法により K901 を形質転換した。K901 は 2 倍体であるため、挿入配列が一部異なる 2 種類の完全欠失ベクターを作製して形質転換を 2 回行い、*MRI1* の両対立遺伝子が完全欠失した株を取得した。得られた *MRI1*-SC-D 株と親株および K901-*mri1Δ* 株を用いて総米 300g の清酒小仕込み試験を行い、発酵過程や製成酒の各種成分、DMTS-P1 濃度、DMTS 生成ポテンシャルの分析および香りの官能評価を行った。
【結果】セルフクローニング法により K901 の *MRI1*-SC-D 株が 1 株得られた。清酒小仕込み試験の結果、発酵過程や製成酒の各種成分については *MRI1*-SC-D 株、親株、K901-*mri1Δ* 株の間で大きな違いは見られなかった。一方、*MRI1*-SC-D 株と K901-*mri1Δ* 株の製成酒における DMTS-P1 濃度および DMTS 生成ポテンシャルは、親株のものに比べ著しく低減した。製成酒の貯蔵前官能評価試験では、*MRI1*-SC-D 株、親株、K901-*mri1Δ* 株の間で香りの品質に差は見られなかったが、40℃で 3 か月貯蔵後の官能評価試験では、*MRI1*-SC-D 株と K901-*mri1Δ* 株の製成酒は親株のものに比べて、老香および硫黄様のにおいが弱い傾向が見られた。これらのことから、醸造特性や製成酒の品質は保持したまま老香の生じにくい清酒酵母を作製することができた。

DMTS, Self-cloning, sake yeast

講演番号：3C23a10
講演日時：3 月 19 日 11:45～ C 校舎 23 会場

清酒酵母の自然染色体部分倍加による代謝制御
Regulation of metabolism of sake yeast by the naturally-occurring increase of aneuploid chromosomes

○門脇 真史[1]、田口 誠我[1]、澤田 和敬[2]、浜島 弘史[1]、赤尾 健[3]、野口 英樹[4]、豊田 敦[4]、藤山 秋佐夫[4,5]、北垣 浩志[1]（[1]佐大農、[2]佐賀工技セ、[3]酒総研、[4]遺伝研、[5]総研大・遺伝学専攻）
○Masafumi Kadowaki[1], Seiga Taguchi[1], Kazutaka Sawada[2], Hiroshi Hamajima[1], Takeru Akao[3], Hideki Noguchi[4], Atsushi Toyoda[4], Asao Fujiyama[4,5], Hiroshi Kitagaki[1] ([1]Saga Univ., [2]Saga Ind. Tech. Cent., [3]National Research Institute of Brewing, [4]National Institute of Genetics, [5]Grad. Univ. Adv. Stud.)

**[背景及び目的]**
醸造酵母の育種法には、突然変異や交雑育種法があるが SNP などの特定の遺伝子の配列レベルの変化を元に行われてきた。本研究では、我々は染色体数の変化が酵母の醸造特性に変化を起こし育種のターゲットになることを報告する。αトランスシアノ桂皮酸エチルに耐性を持つ株として分離したピルビン酸低減酵母 TCR7 株と親株である K7 株のゲノムを次世代シークエンサーで解析したところ、TCR7 では 11 番と 14 番染色体、K7 では 11 番染色体が通常の株と比較して、1.5 倍のシグナル量を示したことから染色体が部分的に倍加していることがわかった。染色体の部分倍加がピルビン酸の低減につながっていると考え、その仮説を検証するために染色体数の異なる一倍体を多数取得しその代謝物を解析した。

**[方法]**
一倍体を取得するために、栄養飢餓培地を用いて TCR7 株に胞子形成を起こし、一倍体候補株を多数取得し、PCR とフローサイトメトリーを用いた。染色体の部分倍加の解析には q-RT-PCR を用いた。代謝物の解析には、清酒小仕込み試験を行った清酒成分の HPLC と GCMS で分析した結果を用いた。得られた代謝物データを説明変数にセットして Simca を用いて主成分分析を行った。

**[結果]**
取得した一倍体 45 株では単一の染色体が倍加している株や、複数本の染色体が部分倍加している株を確認できた。染色体の部分倍加数の多い株の方が低ピルビン酸濃度を示している傾向が見られたので、ピルビン酸濃度と染色体の数について相関係数を求めたところ、-0.298 となり逆相関を示した($p<0.001$)。GCMS での成分分析では 42 個の代謝物が検出され、その内 23 個を同定することができた。その代謝物の面積値データとピルビン酸濃度を使った主成分分析の Score plot と Loading plot を解析したところ、複数本倍加している酵母にはアミノ酸、特に分岐鎖アミノ酸が正の相関を示した。これらの化合物はミトコンドリア内においてピルビン酸の下流に位置することから、部分倍加した複数の染色体を持つ株は遺伝的相互作用によりミトコンドリアが活性化し、ピルビン酸低減性を獲得すると考えられた。このことから、染色体数の部分倍加が代謝を変化させ、ピルビン酸の減少を引き起こすことが明らかになった。本研究は染色体の部分倍加が醸造酵母の代謝を変化させるという初めての報告である。

aneuploidy, sake yeast, metabolome analysis

発表責任者：北垣浩志（ktgkhrs@cc.saga-u.ac.jp）

講演番号：3C23p01
講演日時：3 月 19 日 14:00～ C 校舎 23 会場

キレの良いビールを造る下面発酵酵母の高発酵力とその遺伝子解析
Genetic analysis of bottom-fermenting brewer's yeast exhibiting high fermentation performance and imparting good *kire* (crispness) to beer taste
○大室 繭、本山 靖朗、渡邊 哲也（アサヒビール株式会社）
○Mayu OOMURO, Yasuo MOTOYAMA, Tetsuya WATANABE (ASAHI BREWERIES, LTD.)

ビール醸造において、酵母はアルコール生成のみならず香味に関しても重要な役割を果たす。ビール酵母は麦汁中の糖からエタノールと炭酸ガスを生成する他、麦汁中の成分から種々の香味成分を生成するが、その機構については未だ不明な点も多い。近年、遺伝子解析技術を用いてビール酵母の性質を明らかにしようとする研究が多くなされており、下面発酵ビール酵母（*Saccharomyces pastorianus*）の低温増殖能、凝集能、マルトース資化能や硫黄代謝物質生成能に関わる遺伝子等が明らかとされ、遺伝子情報把握による醸造、発酵現象の理解が可能となってきている。本研究では、弊社主力ビール商品の製造に使用している酵母（*S. pastorianus*）について、次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析を行うことでその特徴把握を試みた。当該商品は、高い発酵力を持つ酵母を使用し、一般的にキレと定義される、「風味（味、香り）に落差があって、かつ突出した風味が残らない」官能特性を追求したビールである。ビール酵母の発酵力は糖やアミノ酸の取り込み速度や量に影響し、取り込み残しはビール製品の香味に関わり、キレにも影響すると考えられている。我々は、当該ビール製造において、過去の試験にて親株（*S. pastrianus*）よりも発酵力が高く、また官能評価においてキレ評価の高い、商品の香味コンセプトに合った酵母集団を選抜し、現在使用している。本研究では、両株の遺伝子比較解析を実施することにより、発酵に寄与する遺伝子の同定を試みた。染色体ごとのコピー数を解析した結果、選抜株では親株と比較して、いくつかの染色体のコピー数が増加していることが明らかとなった。この結果は、両株の発酵中における遺伝子発現解析でも相関が取れていた。違いが見られた染色体には、グルコース感知、タンパク質合成、解糖系に関わる遺伝子が座乗しており、選抜株の発酵力の高さは、上述遺伝子のコピー数、発現量の増加によるグルコース取り込み、増殖及び解糖系促進が一因と推察された。ここでは、グルコース感知に関わる遺伝子に着目して解析を進めた。下面発酵ビール酵母 *S. pastorianus* Weihenstephan34/70 を用いて当該遺伝子の過剰発現株を作成し、発酵試験によりその発酵速度を評価したところ、親株よりも発酵速度が向上することを確認した。以上の遺伝子解析結果により、選抜株の発酵力の高さに寄与する遺伝子の一端が明らかとなり、親株集団よりも、上述した遺伝子のコピー数が平均として増加しているポピュレーションが形成された選抜株を用いて発酵させることで、商品コンセプトに合った香味が実現出来ていることが示唆された。本研究は、遺伝学アプローチにより選抜株の発酵力の高さを裏付けしたものである。今後、製品のキレとの関連解明の他、上述遺伝子をターゲットとして発酵制御や酵母選択技術開発へ繋げていきたい。

alcoholic fermentation, *Saccharomyces pastorianus*, next-generation sequencing

発表責任者：大室　繭（mayu.oomuro@asahibeer.co.jp）

講演番号：3C23p02
講演日時：3 月 19 日 14:15～ C 校舎 23 会場

泡盛酵母の NaCl 耐性に関わる遺伝子の探索
Exploration of genes for NaCl tolerance in Awamori yeast.
○吉田 嵩策、外山 博英（琉大農・亜熱生資）
○Shusaku YOSHIDA, Hirohide TOYAMA (Dept. of Biosci. Biotech. Fac. of Agr., Univ. of Ryukyus)

【目的】
泡盛醸造で主に用いられている泡盛酵母が他の酵母に比べ高い NaCl 耐性を有していることが明らかとなった。そこで、泡盛酵母のゲノムライブラリーを作製し、実験室酵母の NaCl 耐性を向上させる遺伝子を探索することにした。また、泡盛酵母を UV 処理し、NaCl 耐性の低下した変異株を取得し、その変異を回復させる遺伝子の探索も行うことにした。
【方法】
泡盛酵母 101-18 株、その栄養要求性株 YSY0001 株（101-18 *ura3*Δ*::kan*$^r$）、及び実験室酵母 BY4741 株（*MATa*, *leu2*Δ0, *his3*Δ1, *ura3*Δ0, *met15*Δ0）を供試菌株とした。
ベクターとして用いる YEp13 は、*Bam*HI で切断後アルカリフォスファターゼを用いて脱リン酸化した。101-18 ゲノム DNA は、*Mbo*I を 0.5 U/μg-DNA となるように加え 37˚C で 30 分間反応させ、5～20 kb 程度の大きさに部分切断した後、YEp13 とライゲーションした。出来たプラスミドを BY4741 株に酢酸リチウム法を用いて形質転換した。選択培地にはロイシンを除いた合成培地(-L 培地)を用いた。得られた形質転換体はプレートごとにまとめ、YEp13 のみを形質転換した BY4741 株が生育できない NaCl を 8%添加した YPD での良い生育を示した試験管の菌液を-L 寒天培地にスプレッドした。得られたコロニーについて 96 ウェルプレートを使って生育比較を行い、NaCl 耐性の向上した形質転換体を選別した。再度試験管を用いて NaCl を 8%添加した YPD 培地で生育を確認した。
UV 変異株を取得するために YSY0001 株を YPD 寒天培地で一晩前培養し、菌体を滅菌水に懸濁し、懸濁液を YPD 寒天培地にスプレッドして、60 秒間 UV を照射（生存率 1%）した。2 日間培養して出現したコロニーについて生育比較を行った。
【結果】
BY4741 形質転換体 3049 株から NaCl を 8%添加した YPD 培地で生育できる株 95 株が得られた。この中から特に生育のよかった形質転換体 13 株を選抜した。これらの株からプラスミド DNA を回収し、挿入されている DNA の塩基配列の決定を試みている。
泡盛酵母を UV 変異処理して得られた 95 コロニーについて 10%NaCl を添加した YPD 培地での生育を比較したところ、6 株の生育が親株に比べ明らかに悪くなっていた。このうち 2 株は 9%NaCl を添加した YPD 培地で生育しなくなっていた。

Awamori, Salt tolerance, *Saccharomyces cerevisiae*

発表責任者：外山博英（toyama@agr.u-ryukyu.ac.jp）

講演番号：3C23p03
講演日時：3 月 19 日 14:30～ C 校舎 23 会場

# 清酒の呈味性ピログルタミルデカペプチドエチルエステル（PGDPEs）の同位体希釈分析法（SIDA）による定量と閾値

# Quantitation using a Stable Isotope Dilution Assay (SIDA) and Thresholds of Taste-Active Pyroglutamyl Decapeptide Ethyl Esters (PGDPEs) in Sake

○橋爪 克己、五十嵐 信也、高橋 樹、伊藤 俊彦 (秋田県大)
○Katsumi Hashidume, Shinya Igarashi, Itsuki Takahashi, Toshihiko Ito (Akita Prefectural Univ.)

【目的】演者らは TDA（Taste Dilution Analysis）法を用いて清酒の疎水性呈味成分を網羅的に解析し、2 つの呈味性ピログルタミルデカペプチドエチルエステル（PGDPE1；(pGlu)LFGPNVNPWCOOC$_2$H$_5$, PGDPE2；(pGlu)LFNPSTNPWCOOC$_2$H$_5$）を単離・同定した[(1)]。清酒中のこれらペプチド濃度を MS により定量したが、低レベルであること、Na 付加物や多価イオンが生成すること、共存成分によって ESI 時のイオン化率が著しく変動することなどの問題があった。また、これらペプチドの清酒中の閾値は未検討である。そこで、これらペプチドの安定同位体希釈分析法（stable isotope dilution assay, SIDA）による定量法の開発と清酒中の閾値の推定を行った。
【実験材料および方法】PGDPE 標品は、ピログルタミル N 末を持つペプチドの C 末端を Kim らの方法[(2)]によりエチルエステル化して調製した。重水素ラベルした標品は、無水エタノール-D6 を用いて同様の方法により調製した。ペプチドレベルを測定した清酒試料は市場から購入した。清酒中のペプチドは重水素ラベルした標品を一定量添加後、C18 カラムにより簡易な精製を行い、濃縮試料を高分解能 MS により分析した。閾値は BCOJ 官能評価法に準じ、市販清酒にペプチド標品を添加した試料を 20 代学生パネル 11 名により評価し、推定した。
【結果】①開発した安定同位体希釈分析法（SIDA）は、検量線の直線性、検出感度、再現性および添加回収試験において問題のない特性を示した。②清酒中の認知閾値は、PGDPE1 は 3.8 μg/L 、PGDPE2 は 8.1μg/L と推定された。評価パネルの約半数は苦味、渋味などの味わいを感じペプチドを好ましくないものとして評価したが、残りのパネルはペプチドによってもたらされる味わいの濃さや丸みが好ましいと評価した。③18 点の市販清酒試料中の PGDPE1 および PGDPE2 の最高濃度は推定された認知閾値のそれぞれ 8 倍および 25 倍であった。このことから、PGDPE は清酒で官能的に意味のある役割を果たすことが示唆された。④試料清酒を 6℃で 50 日間貯蔵して PGDPE を分析したところ生酒試料では貯蔵前の分析結果と比較してレベル低下が見られた。火入れ酒ではほとんど変化が見られなかったことから、このレベル変化は酵素反応によることが推定された。

参考文献(1) Hashizume *et al. Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76, 1291-1295 (2012)
(2) Kim *et al. Anal. Chem.* 77, 4185-4193 (2005)

sake, peptide, taste

発表責任者：橋爪克己（hashizume@akita-pu.ac.jp）

講演番号：3C23p04
講演日時：3 月 19 日 14:45～ C 校舎 23 会場

麹グルコシルセラミドが酵母の代謝特性に及ぼす生理的役割に関する研究
Physiological function of koji glycosylceramide on the metabolic properties of Sake yeast
○上田 真利奈[1]、中畑 絵里子[1]、澤田 和敬[2]、浜島 弘史[1]、髙峯 和則[3]、北垣 浩志[1] ([1]佐大農、[2]佐賀工技セ、[3]鹿大農)
○Marina UEDA[1], Eriko NAKAHATA[1], Kazutaka SAWADA[2], Hiroshi HAMAJIMA[1], Kazunori TAKAMINE[3], Hiroshi KITAGAKI[1] ([1]Saga Univ., [2]Saga Ind.Tech, [3]Kagoshima Univ.)

【背景及び目的】
日本のほとんどの発酵食品、飲料の製造においては麹と酵母が共同して使われるが、西洋型の発酵と異なり糖化剤として麹を使う意義については充分に理解されていない。当研究室では、これまでに麹を作る麹菌から麹菌特有の
glycosylceramide(N-2'-hydroxyoctadecanoyl-l-O-β-D-gluco(galacto)pyranosyl-9-methyl-4,8-sphingadienine, d18:2m/C18:0h; GlcCer）を見出し、酒類発酵中において酵母がこの麹 GlcCer を細胞内に取り込み利用することによって、アルカリ耐性やエタノール耐性などのストレス耐性を獲得することを明らかにしてきている 1)。そこで本研究では、精製 GlcCer を酵母と共培養し GC/MS を用いて複数の代謝物を対象とした分析を行うことで、GlcCer が酵母に生理的特性を付与するメカニズムの解明を試みた。

**[方法]**
酵母は協会 7 号清酒酵母を用い、3mlYPD 液体培地（1 % yeast extract, 2 % bactopeptone, 2 % glucose）に植菌し、振とう培養（30 ℃, 24 h）した。分光光度計を用いて OD を測定した後、本培養液（麹エキス）5ml あたり、酵母 $0.1\times10^7$cells を回収し、菌体洗浄を行った。本培養液 5ml に対して Nonidet40 5 µl を加えたものを本培養培地とし、この本培養培地に GlcCer 50µl を添加することで、酵母と GlcCer の共培養を行った。また、コントロールとしてこの本培養培地にエタノール 50µl を加えたものを準備した。各サンプルには流動パラフィンを 1ml ずつ添加して、静置発酵した。得られた酵母の内生代謝物と外生代謝物の成分及び香気成分を GC/MS 等を用いて分析した。GC/MS により検出された面積値は、その後の統計処理に使用した。

**[結果]**
GC/MS 分析の結果、アミノ酸や有機酸、糖を初めとする、内生代謝物では 71 種（17 成分を同定）、外生代謝物では 71 種（15 成分を同定）の成分を確認できた。加えて、GlcCer を添加することで複数の成分における濃度が変化していることを明らかにした。また、香気成分も変化しており GlcCer 添加画分で脂肪酸エチルエステル成分などが減少していることが示された。これらの結果から、麹 GlcCer はストレス耐性だけでなく代謝物の変化、香気成分の変化など酵母に様々な代謝変化を起こし、酵母の醸造特性に影響を及ぼしていることが示された。

1) Appl Environ Microbiol. 2015 Jun;81(11):3688-98

glycosylceramide, koji, coculture

講演番号：3C23p05
講演日時：3 月 19 日 15:00～ C 校舎 23 会場

# 協会酵母と花から分離した野生酵母とのイソマルトース資化性の違いが清酒の味に与える影響

# Effect of isomaltose assimilability of a Kyokai sake yeast and a wild yeast isolated from a flower on the sakes' tastes.

○大原 礼仁[1]、望月 麻衣[1]、船越 吾郎[2]、三井 俊[2]、伊藤 彰敏[2]、志水 元亨[1]、加藤 雅士[1]([1]名城大農、[2]あいち産業技術セ・食品工業技術セ)
○Reiji Ohara[1], Mai Mochizuki[1], Goro Funakoshi[2], Shun Mitui[2], Akitoshi Itou[2], Motoyuki Shimizu[1], Masashi Kato[1] ([1]Meijo Univ., [2]Aichi Center for Industry and Science Technology.)

【目的】和食がユネスコの無形文化遺産に登録されたことで、日本酒が世界的に注目されるようになった。一方、国内での日本酒の消費量は減少傾向にあり、多様化したアルコール飲料へのニーズに対応する日本酒の開発が求められている。それには、従来の清酒にない新たな特徴を付与した清酒の醸造が必要である。我々はキャンパス内の花（カーネーション）から酵母を分離し、清酒の醸造に用いることで、これまでの清酒とは異なる香味を持つ極めて甘口の名城大学ブランド日本酒『華名城（はなのしろ）』を開発した。

本研究では、カーネーションから分離した野生酵母（MC9-3）および一般的な清酒製造に用いられる酵母（協会酵母 9 号：K901）を用いて製造した清酒の成分を比較することで、野生酵母を用いて醸造した清酒に特徴的な成分を見出すこと目指した。

【方法・結果】本学附属農場のカーネーションから単離した *Saccharomyces cerevisiae*（MC9-3）の醸造特性を明らかにするために、MC9-3 を用いて清酒の小仕込み試験を行ない、GC-MS、還元糖分析用 HPLC などの各分析法を用いて清酒中の成分を解析した。対照には K901 を用いた。

K901 を用いて醸造した清酒に比べて、MC9-3 を用いて製造した清酒ではアルコール度と日本酒度が低く、酸度が高いことが分かった。HPLC にて有機酸を分析したところ、K901 と比較して、MC9-3 を用いて醸造した清酒では酢酸が 1.9 倍多かったことから、MC9-3 で醸造した清酒の酸度は、酢酸によるものであることが示された。日本酒度が低いことから MC9-3 を用いて醸造した清酒には多くの糖が含まれていると考えられたため、還元糖分析用 HPLC を用いて清酒に含まれる糖を分析した。その結果、MC9-3 で醸造した清酒には K901 で醸造した清酒の 25 倍のイソマルトースが含まれていた。次に、酵母の発酵に伴うイソマルトース量の変化を調べるため、麹菌によって米を糖化した米糖化液を調製後、K901 および MC9-3 を加え、発酵液中のイソマルトース量を経時的に測定した。調製した米糖化液中のイソマルトース濃度は 46 mM であったが、K901 を加え発酵させることで経時的に減少し 18 日後には 9.0 mM まで減少した。一方、MC9-3 の添加ではイソマルトース濃度はほとんど変化せず、18 日後にも 41 mM のイソマルトースが残存していた。また、K901 および MC9-3 を用いた発酵液中のグルコース濃度はそれぞれ 24 mM および 19 mM であった。これらのことから、MC9-3 を用いて醸造した清酒の甘みは主にイソマルトースに起因することが示唆された。さらに、イソマルトースを唯一の炭素源とする培地にそれぞれの酵母を接種することで、K901 と MC9-3 のイソマルトース資化性を調べた。その結果、K901 は培養 2 日目から徐々に増殖し、培養 3 日目には接種時の 3 倍以上まで増加した。一方、MC9-3 はほとんど増殖しなかった。

以上の結果から、本研究で醸造した野生酵母清酒の甘みは機能性オリゴ糖として知られるイソマルトースに由来しており、その含有量の違いは、協会酵母 K901 と野生酵母 MC9-3 のイソマルトース資化性に起因することが明らかとなった。

*S.cerevisiae*, isomaltose, sake

発表責任者：大原礼仁（130562009@ccmailg.meijo-u.ac.jp）

講演番号：3C23p06
講演日時：3 月 19 日 15:25～ C 校舎 23 会場

# 高度精白米の品質向上のための精米プログラムに関する研究

# Study on the polishing program for improvement of the quality of highly polished rice

○中村 諒[1,2]、市川 絵梨[1]、廣川 豊和[1]、宮内 英昭[1]、田村 博康[1]、佐藤 謙仁[1]、安澤 義彦[1]、平田 大[1,2] ([1]朝日酒造(株)、[2]広大院　先端研)
○Ryo NAKAMURA[1,2], Eri ICHIKAWA[1], Toyokazu HIROKAWA[1], Hideaki MIYAUCHI[1], Hiroyasu TAMURA[1], Kenji SATO[1], Yoshihiko ANZAWA[1], Dai HIRATA[1,2] ([1]Asahi-Shuzo Sake Brewing Co., Ltd., [2]Hiroshima Univ. AdSM)

【背景と目的】

清酒製造の原料は米と水である。一般的に、原料米のタンパク質の増加は製成酒の雑味の原因になるため、大吟醸酒などの高品質清酒製造においては高度精白米が使用される。通常、精米歩合 50%以下に高度に精米すると、厚さ方向と比較し、長軸方向（縦・長さ方向）が主に削られ、その結果、厚さ方向のタンパク質が十分には除去されない。それゆえ、高度精米においては、タンパク質を効果的に除去するための原形精米が望まれる。これまで、効果的なタンパク質除去を目的に、扁平精米などの精米方法の有効性が示されてきたが、高度精白米における検証は未公表であった。

そこで、我々は、高度精白米の品質向上を目的として、原形精米用の精米プログラムの効果を評価（評価項目：無効精米歩合、整粒歩合、白米形状等）、検証してきた（安澤ら， 2016）。本研究では、先に公表した精米プログラムを改良し、五百万石と越淡麗の高度精白米について、その有効性を検証した。

【方法と結果】

改良型原形精米プログラム（改良 P）は、通常の精米プログラム（通常 P）と比較し、精米に長時間を要した。一方、先の報告と同様、改良 P は、通常 P と比較し、無効精米歩合が低く、整粒歩合も高い値を示した。白米形状（長さ、幅、厚さ）を測定した結果、高度精白米においては、改良 P は、通常 P と比較し、有意に長さは大きく、厚さは小さく、より扁平な形状となった。また、ケルダール法により精白米の粗タンパク質含有量を測定した結果、改良 P は、通常 P と比較し、有意に粗タンパク質含有量が低いことが確認された。さらに、製成酒への影響を調べるため、両プログラムによる白米を掛け米として用いた小仕込み試験を実施した。その製成酒の分析結果についても報告する予定である。

関連論文：安澤ら，「酒造好適米越淡麗及びたかね錦の高度精白米の形状に及ぼす精米条件の影響」日本醸造協会誌 111 (6), 412-419 (2016)

crude protein, polishing program, sake rice

講演番号：3C23p07
講演日時：3 月 19 日 15:40～ C 校舎 23 会場

# 製麹条件の違いによる品温経過と酵素生産への影響

# The influence on temperature couse and enzyme production of koji by difference in preparation of koji-making

○谷野 有佳[1]、伊藤 一成[1]、五味 勝也[2]、狩山 昌弘[3]、三宅 剛史[1] ([1]岡山県工技セ、[2]東北大院農・生物産業創成、[3]株式会社フジワラテクノアート)
○Yuka TANINO[1], Kazunari ITOU[1], Katsuya GOMI[2], Masahiro KARIYAMA[3], Tsuyoshi MIYAKE[1] ([1]Technology Center of Okayama Prefecture, [2]Tohoku University, [3]Fujiwara Techno-Art Co, Ltd.)

【目的】清酒製造現場における製麹では、様々な条件、状態及び環境のもと、目的の品温経過を目指した作業 (制御) が適時行われている。しかしながら、目的にあった品質の麹を製造するために、実際にどのような制御と品温経過を実現すれば良いのかについての科学的な指標はあまりない。我々は、これまでに製造現場に応用できる実験室レベルでの試験製麹法を構築してきた。本方法は製麹中の基質の均一な培養状態の維持とその制御を可能にする技術である。この技術を用いて、目的品質の麹を製造するために必要な制御と品温経過を明らかにすることを目指している。しかし、目的の品温経過にするために必要な制御は発熱状態の違いによって大きく影響を受けることから、始めに初期条件を設定したときの発熱状態を把握しておく必要がある。そこで本研究では、まず胞子接種量と堆積厚を変えたときの発熱状態を把握し、品温経過と酵素生産への影響を検討したので報告する。
【方法】精米歩合 60%の雄町 200 g を基質とし、培養開始時に吸水歩合 32wt%になるよう調製した。これに清酒用麹菌 *Aspergillus oryzae* RIB128 を植え付け、培養器である無通風箱の中に入れた。恒温恒湿槽内で 30℃, 95%RH の環境下で 24 時間培養した後、12 時間かけて 40℃設定まで上昇させ、さらにそのまま 12 時間、計 48 時間培養した。この間、相対湿度は 95%RH を維持した。この培養条件を基準とし、基質の堆積厚を 2 倍、または胞子接種量を 10 倍に増量して培養を行った。培養期間中の麹の品温と湿度はデータロガーにより収集した。培養後、米麹の各酵素力価を測定した。
【結果】胞子接種量を 10 倍にした場合、堆積厚を 2 倍にした場合のどちらでも、基準の培養と比較して品温経過に変化がみられた。胞子接種量を 10 倍にすると、基準より早く設定温度以上に品温が上昇し始めたが、最終的な品温はほとんど変わらなかった。一方で堆積厚を 2 倍にすると、同様に基準より早く設定温度以上に品温が上昇し始めたが、その上昇は大きく最高品温は基準の約 2.5℃高い結果となった。これら培養後の米麹の酵素力価を測定したところ、胞子接種量を 10 倍にすると基準より各酵素活性が増大していた。胞子接種量を増やしたことで菌体量も増加し、そのために酵素活性も増加したと考えられる。一方で、堆積厚を 2 倍にすると基準より各酵素活性は減少していた。基質を増加させたことにより基質が保持する水分も増加し、乾燥するまでに時間がかかったことが要因ではないかと推測している。

koji-making, enzyme production, fermentation heat

講演番号：3C23p08
講演日時：3 月 19 日 15:55～ C 校舎 23 会場

# 米麹の破精の観察とその評価法の確立

# Observation of *haze* of rice *koji* and establishment of its quantitative evaluation method

○伊藤 一成[1]、谷野 有佳[1]、五味 勝也[2]、狩山 昌弘[3]、三宅 剛史[1] ([1]岡山県工技セ、[2]東北大院農・生物産業創成、[3]株式会社フジワラテクノアート)
○Kazunari ITO[1], Yuka TANINO[1], Katsuya GOMI[2], Masahiro KARIYAMA[3], Tsuyoshi MIYAKE[1] ([1]Industrial Technology Center of Okayama Prefecture, [2]Tohoku Univ., [3]Fujiwara Techno-Art Co, Ltd.)

【目的】　多くの清酒製造現場では、長年培ってきた杜氏の経験と勘に頼った製造が行われており、科学的根拠に基づく評価が未だ十分ではない。我々は清酒製造工程のうち最も重要である製麹に着目し、麹の品質安定・向上のために品質評価指標の構築を目指している。製造現場では麹の品質評価指標の 1 つとして、麹菌が蒸米に増殖して白く観察される現象である破精を重要視しており、麹菌の増殖及び酵素生産の代替指標として利用している。破精が白く見えるのは、菌糸とその周辺の米組織の粒状崩壊による光の乱反射によるものと言われている。破精の形成はリアルタイムに肉眼で確認することができることから、製麹工程において手軽に麹の品質評価指標として利用できるものの、その数値化はほとんど行われておらず、製造現場では目視による大まかな破精形成の確認が行われ、これまでに蓄積してきた経験から麹の品質を判断している。科学的根拠に基づいて麹の品質と破精の関係を述べるには、破精の数値化が必須である。そこで本研究では破精の評価法確立について検討した。
【方法】　試験製麹は無通風箱培養法（1 バッチ当たり 200g の中規模スケール）で行った。精米歩合 60%の岡山県産雄町を使用し、蒸煮後 32wt%の吸水歩合になるよう水分調製した。これに清酒用麹菌 *Aspergillus oryzae* RIB128 株の胞子を植え付けた。培養器を恒温恒湿槽内に静置し、30℃, 95%RH の環境下で 24 時間培養した後、12 時間かけて 40℃設定まで上昇させ、さらにそのまま 12 時間、計 48 時間培養した。この間、相対湿度は 95%を維持した。このような条件で得た麹を破精の評価に使用した。破精回りは麹粒表面を、破精込みは鋭利なカッターで麹粒中央部を横方向に薄くスライスしたものの表面をデジタルマイクロスコープを用いて一定条件下で撮影した。得られた画像から解析ソフトウェアにより破精の数値化を試みた。
【結果】　デジタルマイクロスコープの観察により破精ありと判断した白い部分には菌糸と米組織の崩壊が電子顕微鏡で確認された。一方、破精なしと判断した黒い部分にはそれらが確認されなかった。このため今回の観察と画像解析が破精の数値化に妥当であると判断した。製造現場で活用できる指標とするためには、バッチとしての破精の評価が重要である。麹粒ごとの破精具合のばらつきから、全体をヒストグラム化すると正規分布からはずれてしまうため、平均値ではなく実際の最頻階級との相関が高い中央値での評価が適していると判断した。また 50 粒以上の麹粒を測定すればほぼ一定値に収束したことから、バッチとしての破精の評価が可能であることが分かった。

*Aspergillus oryzae*, *koji* making, *haze*

講演番号：3C23p09
講演日時：3 月 19 日 16:10～ C 校舎 23 会場

# 酒造好適米・越淡麗に適した種もやしの探索

# Search for the koji starter suitable for the sake rice Koshitanrei

○市川 絵梨[1]、安澤 義彦[1]、中村 諒[1,2]、田村 博康[1]、金桶 光起[3]、岩下 和裕[4]、平田 大[1,2]([1]朝日酒造（株)、[2]広大院・先端研、[3]新潟醸試、[4]酒総研)
○ERI ICHIKAWA[1], YOSHIHIKO ANZAWA[1], RYO NAKAMURA[1,2], HIROYASU TAMURA[1], MITSUOKI KANEOKE[3], KAZUHIRO IWASHITA[4], DAI HIRATA[1,2] ([1]Asahi-Shuzo Sake Brewing Co., Ltd, [2]Hiroshima Univ. AdSM, [3]Niigata Prefectural Sake Research Institute, [4]National Research Institute of Brewing)

【背景及び目的】

越淡麗は、新潟県において、五百万石の精米特性を改善する目的で、五百万石と山田錦とを交配することにより開発された酒造好適米である。越淡麗に関する研究は、精米歩合 30%までの高度精白米を用いた精米特性と醸造特性について実施されているが[1)]、更なる詳細な解析が求められている。そこで、本研究では、清酒醸造の重要工程の一つである製麹に着目し、越淡麗に適した麹菌の探索を目的として、市販の種もやしを用いた小スケールでの製麹試験を行った。さらに、酵素活性以外の麹の特徴把握を目的として、麹の香味による特性調査を行った。

【方法・結果】

新潟県で一般的に使用されている五百万石を比較対照として、市販の種もやし 6 種を用いて、以下の 2 段階のスクリーニングにより、越淡麗に適した種もやしの探索を試みた。１次スクリーニングでは、α化米を用いた小スケール製麹試験を行い、2 次スクリーニングでは、白米を用いた小スケール製麹試験を行った。各スクリーニングの方法及び結果を以下に記載する。

（１）α化米での製麹試験

シャーレ法[2)]による製麹試験を行い、得られた麹の各種酵素活性（糖化酵素、タンパク分解酵素）を測定した。酵素活性の結果をもとに、越淡麗を用いた麹で酵素活性の高い種もやし 4 種を選択し、白米での製麹試験に供した。

（２）白米での製麹試験

α化米での製麹試験で選抜した種もやし 4 種を用いて、酒造現場に近い製麹条件で、精米歩合 50%の白米を用いた小スケール製麹を行った。得られた麹の各種酵素活性を測定し、種もやしによる差異を確認した。また、清酒中での麹由来の香味を把握すべく、製麹した麹を用いて甘酒を作成し、複数のパネラーによる官能評価を行った。現在、麹の香味による麹の特徴把握について、さらに、検討中である。

１）Anzawa et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 77(10), 2160-2165 (2013)
２）岡崎直人ら：醸協,73(5),402-404(1978)

sake rice, Koshitanrei, koji

講演番号：3C23p10
講演日時：3 月 19 日 16:25～ C 校舎 23 会場

モロミックス解析による清酒中のアルギニン・アグマチンの生産性に関連する遺伝子の同定
Moromics approach identified a gene, associate with productivity of arginine and agmatine in Japanese sake

嶋本 孝平[2]、河内 護之[3]、織田 健[1]、○岩下 和裕[1]([1]酒類研、[2]広島大院・生物圏、[3]東大農)
Kouhei Shimamoto[2], Moriyuki Kawauchi[3], Ken Oda[1], ○Kazuhiro Iwashita[1] ([1]NRIB, [2]Hiro Univ., [3]Tokyo Univ.)

【目的】麹菌（*Aspergillus oryzae*）は、醸造産業では製品の種類や品質により様々な菌株が使用されている。当研究室ではこれまでに 55 株の麹菌のゲノムアレイによる系統解析を行うとともに、これらの株を用いた米麹の特性、発酵特性、清酒のメタボローム解析等を行ってきた。その結果、同系統菌株を用い醸成した清酒のメタボーム像は類似することを示した。しかし、同系統の菌株であっても清酒中の苦味成分であるアルギニンの量はばらついており、ほとんど検出されない株もあった。また、アルギニンと逆相関する成分としてアグマチンを同定したことを報告していた。そこで、アルギニンとアグマチンの生成量の差が大きく、かつ同系統に含まれる菌株について比較ゲノム解析を行い、原因遺伝子を同定する事を目的とし研究を行った。
【方法・結果】アルギニン生成量は、酒・味噌系統内の麹菌株で変動が大きく、本系統には清酒麹菌のモデル株で、我々がゲノムシーケンスを取得している RIB128 株が属する。そこで、本系統内でアルギニンが多くアグマチンが少ない 3 株（RIB128 株を含む）と、アルギニンが少なくアグマチンが多い 3 株について、再現性を確認した後に、RIB128 株以外の 5 株について HiSeq により全ゲノムシークエンシング解析を行った。各菌株で QV が 30 以上の配列を 4Gbps 以上取得し、RIB128 株をリファレンスゲノムとしてマッピングを行い、Genome Analysis Toolkit（GATK）により変異点の同定を行った。その結果、RIB128 株に対して各株で 300 程度の変異が同定された。そこで、原因遺伝子を絞り込むために、「アルギニンをアグマチンに変換する経路に活性化変異が起きている」あるいはその逆等の仮説を立てて絞り込みを行った。その結果、A0090003000489 遺伝子内に、アルギニンを生産する株のみで変異が見られた。本遺伝子は、麹菌の二次代謝制御遺伝子として知られている *laeA* をコードしている。そこで我々は、*laeA* の破壊株と高発現株の両方を用いて、製麹を行い、小仕込みにより清酒を作成しメタボローム解析を行った。その結果、コントロール株ではアルギニン生産と少量のアグマチン生産が見られるのに対し、破壊株ではアルギニン生産に大きな変化は見られず、アグマチンが消失していた。一方、高発現株ではアルギニンの生成がほとんど見られず、反対にアグマチンの増加が確認された。このことから *laeA* はアルギニンからアグマチンへの反応を行う経路の制御に関連していると考えられた。

Aspergillus oryzae, comparative genomics, metabolome analysis

発表責任者：岩下和裕（i25775@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：3C23p11
講演日時：3 月 19 日 16:50～ C 校舎 23 会場

ポジティブセレクションが出来ない遺伝子の麹菌ゲノム編集法の開発
Development of genome editing technique for *Asprgillus oryzae* genes that are unable to positive selection

○嶋本 孝平[1,2]、齋藤 亮太[1]、和田 悠作[3]、織田 健[1]、奥田 将生[1,2]、岩下 和裕[1]([1]酒類総合研究所、[2]広島大院・生物圏、[3](株)ファスマック)
○Kouhei SHIMAMOTO[1,2], Ryouta SAITOU[1], Yusaku WADA[3], Ken ODA[1], Masaki OKUDA[1,2], Kazuhiro IWASHITA[1] ([1]NRIB., [2]Hiroshima Univ., [3]Fasmac Co., Ltd.)

【目的】麹菌は、産業で広く利用されている微生物で、宿主・ベクター系や相同組換え系の開発により遺伝子改変が可能である。こうした技術や突然変異処理による育種は煩瑣である上、オフターゲットな変異が産業株ではしばしば問題となる。そこで近年、標的部位を迅速かつ簡便に編集できるゲノム編集技術の CRISPR/Cas9 システムが注目されている。一般にこのシステムは、構築した Cas9 プラスミドベクターを導入することで用いられてきた。この場合、外来 DNA を入れる必要があり遺伝子組換体となる。そこで我々は、これまでに *in vitro* で Cas9 タンパク質と標的遺伝子へ Cas9 をターゲットするガイド RNA の複合体（Ribo-Nucleotide protein：RNP）を直接麹菌の細胞内に導入することで標的遺伝子を編集できる技術の開発を行ってきた。しかし、本技術を用いたゲノム編集法ではゲノム編集体の取得率が低く、ポジティブセレクションマーカーとなるような表現型が現れない遺伝子のゲノム編集体を選別するのは事実上困難である。そこで、本研究ではそうしたポジティブセレクション出来ない遺伝子でも本技術によるゲノム編集が行える方法を開発することを目的とした。
【方法・結果】ポジティブセレクションが難しい遺伝子として分生子の着色に関わる *wA* 遺伝子を選択した。はじめに、ポジティブセレクションマーカー遺伝子をターゲット箇所にノックインする方法（Knock in genome edit 法）について検討した。宿主菌株として *pyrG* 遺伝子欠損をしている株を選択した。これに親株である RIB40 株から PCR により得た *pyrG* 遺伝子の DNA 断片、*wA* の RNP を麹菌に直接導入した。その結果、ウラシル要求性が相補された候補株のうち約 8 割が白色分生子であった。これらの株の *wA* 付近を PCR で確認した結果、半数以上で *pyrG* 遺伝子のターゲット箇所への Knock in を確認することが出来た。
次に我々は、ターゲット遺伝子のゲノム編集体を迅速に、より高確率で得られると期待して、マーカーとターゲット遺伝子を同時にゲノム編集する方法（Co-genome editing 法）を検討した。麹菌 RIB40 株に対して、*wA* をターゲットにした RNP 溶液と *pyrG* をターゲットにした RNP 溶液を混合し、麹菌に直接導入した。5-FOA 含有培地で選択の結果、ウラシル要求性が相補された株の 2 割程度が白色分生子となる共ゲノム編集株を得た。
よって本研究により、ポジティブセレクション出来ない遺伝子についてもワンステップでゲノム編集を行う事が可能となり、実用麹菌のゲノム編集に大きな道が示された。

*Aspergillus oryzae*, CRISPR/Cas9, genome editing

講演番号：3C23p12
講演日時：3 月 19 日 17:05～ C 校舎 23 会場

麹菌 *Aspergillus oryzae* の多重代謝改変による遊離脂肪酸の生産性向上
Increase of free fatty acid productivity by multiple metabolic alterations in *Aspergillus oryzae*
○玉野 孝一、小池 英明、三浦 愛（産総研・生物プロセス）
○Koichi TAMANO, Hideaki KOIKE, Ai MIURA (AIST_BPRI)

微生物が生産する遊離脂肪酸やその誘導体は、医薬品・バイオ燃料・健康補助食品やその原料等に利用が期待されている。麹菌 *Aspergillus oryzae* は日本酒・みそ・しょうゆ等の製造に日本古来使われてきた、安全で物質生産能力の高い有用なカビである。我々はこの優れた性質を持つ麹菌において、代謝工学的な遺伝子改変を行うことにより、遊離脂肪酸を高生産化する技術開発を進めてきた。

代謝工学的改変では、遊離脂肪酸の生合成に関わる酵素遺伝子の高発現化、および分解に関わる酵素遺伝子の破壊を網羅的に実施した。その結果、遊離脂肪酸からアシル CoA への変換酵素であるアシル CoA 合成酵素の遺伝子 *faaA* を破壊すると、遊離脂肪酸の生産性は野生株から 9.2 倍に向上することを見出した。当 *faaA* 破壊株の栄養要求性相補や培養条件改良も実施した結果、培養液 1 リットル当り 2.7 グラムの遊離脂肪酸生産を達成した。

次に遊離脂肪酸生合成に使われる NADPH に注目し、NADPH を産生するペントースリン酸経路の強化に取り組んだ。その結果、当経路のトランスケトラーゼ遺伝子を高発現した *faaA* 破壊株は、遊離脂肪酸生産性が *faaA* 破壊株からさらに 1.4 倍向上した。また、菌体収量も *faaA* 破壊株の 1.2 倍に増えたことから、単位培養液量当たりの遊離脂肪酸生産量は両比率を積算した値である 1.7 倍に向上した。さらに、*faaA* 破壊株は液体培養で菌糸が凝集するのに対して、トランスケトラーゼ高発現 *faaA* 破壊株は菌糸が凝集せずに分散した状態になった。このことから、ジャーを用いた高密度培養ができる可能性も見出された。

一方でアシルグリセロール生産量は、いずれの変異株でも野生株からほとんど変化しなかった。

現在、さらなる遊離脂肪酸生産性向上を目指して、一次代謝の部分での代謝改変を実施中である。

*Aspergillus oryzae*, metabolic engineering, free fatty acid

発表責任者：玉野　孝一（tamano-k@aist.go.jp）

講演番号：3C23p13
講演日時：3 月 19 日 17:20～ C 校舎 23 会場

# 日本の伝統発酵食品に含まれている麹グリコシルセラミド含量の解析

# Analysis of the contents of koji glycosylceramide contained in Japanese traditional fermented foods

酒谷 真以[1]、Ferdouse Jannatul[1]、阪本 真由子[1]、浜島 浩史[1]、柘植 圭介[2]、西向 めぐみ[4]、柳田 晃良[3]、永尾 晃治[1]、光武 進[1]、○北垣 浩志[1] ([1]佐賀大学、[2]佐賀県工業技術センター、[3]西九州大学、[4]岩手大学)

Mai Sakatani[1], Jannatul Ferdouse[1], Mayuko Sakamoto[1], Hiroshi Hamajima[1], Keisuke Tsuge[2], Megumi Nishimukai[4], Teruyoshi Yanagida[3], Koji Nagao[1], Susumu Mitsutake[1], ○ Hiroshi Kitagaki[1] ([1]Saga University, [2]Industrial Center of Saga, [3]Nishikyusyu University, [4]Iwate University)

**【背景】**日本の伝統発酵食品の多くに使われている麹にはグリコシルセラミドが多く含まれている。グリコシルセラミドには肌の保湿作用が報告され、大腸癌や頭・首の扁平上皮癌、腸炎防止効果も期待されている。さらに我々は麹グリコシルセラミドには腸内細菌の改善作用があることを報告した[1)]。しかし実際に麹で造られる発酵食品にどのくらいグリコシルセラミドが含まれているかはこれまで報告されていない。そこで麹のグリコシルセラミドを定量的に評価する方法を開発し、各種伝統発酵食品の含量を調べた。

**【方法及び結果】**まずグリコシルセラミドを TLC で解析する方法を検討した。規定量の精製グリコシルセラミドを TLC で展開した後オルシノール硫酸でスプレーしスポットの濃さを定量したところ $p < 0.01$ でグリコシルセラミド量とスポットの濃さは相関していた。発酵食品のグリコシルセラミド含量についても、TLC 上のスポットの濃さで ESI/MS でスフィンゴイド塩基であると確認された OPA-HPLC でのピーク面積から得られる測定値と概ね合致する値が得られることを確認した。以上の結果から、TLC 後オルシノール硫酸で染色したスポットの濃さを定量すれば発酵食品のグリコシルセラミド含量を測定できることが明らかになった。

以上の手法を用いて通常食事で配膳される形での各種発酵食品のグリコシルセラミド含量を測定したところ、甘酒、濁り酒、塩麹に多く含まれており (0.74-4.15 mg)、味噌汁にも一杯 0.37 mg 含まれていることが明らかになった。日本人の一日のグリコシルセラミド摂取量は 26-77 mg であることが報告されていることから、これらの伝統発酵食品を多く食べれば一日のグリコシルセラミドの摂取量を少ない人では 2 倍程度に増やすことができることが明らかになった。グリコシルセラミドの摂取量の 2 倍の増加が栄養学的にどのような意義を持つかはまだわからないが、この程度の摂取量で効果を持つことを示唆するデータもあり、さらなる研究が必要である。

**【謝辞】**本研究は平成 26 年度 農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業【シーズ創出ステージ B タイプ】により行ったものである。

1) *SpringerPlus*, 5, 1321 (2016)

Koji, Glycosylceramide, Japanese fermented foods

発表責任者：北垣浩志（ktgkhrs@cc.saga-u.ac.jp）

講演番号：3C23p14
講演日時：3 月 19 日 17:35～ C 校舎 23 会場

麹グリコシルセラミドによる腸内細菌叢への影響解析
Influence of koji glycosylceramide on the intestinal microbial flora
○佐藤 友哉[1]、加藤 暖菜[1]、浜島 弘史[1]、中山 二郎[2]、北垣 浩志[1] ([1]佐大農、[2]九大農)
○Tomoya SATO[1], Haruna KATO[1], Hiroshi HAMAJIMA[1], Jiro NAKAYAMA[2], Hiroshi KITAGAKI[1]
([1]Saga Univ., [2]Kyushu Univ.)

【目的】麹は味噌、醤油、日本酒、黒酢などの日本の伝統発酵食品製造に用いられている。発酵食品は日本で 1300 年以上の食経験がある伝統食材であり和食の基盤として広く利用されている。日本人の平均寿命は医療水準が同等である他の先進国と比べても高く、その一つの要因として和食があることが考えられる。しかし、和食がどのように日本人の健康に寄与しているのかの具体的なメカニズムはこれまで充分に明らかにされていなかった。その機能性を解明することで和食の新たな品質価値を生み出せる可能性がある。一方、腸内細菌はヒトの健康と密接に関係していることが報告されており、炎症反応の抑制や罹患者と健常者では腸内細菌叢の構成が異なる事が挙げられる。近年、我々は麹にスフィンゴ脂質の一種であるグリコシルセラミド(GlcCer)が含まれ、これが腸内細菌叢を改善することを見出した[1)]。しかし、そのメカニズムはわかっていなかったので、麹 GlcCer が腸内細菌叢を改善するメカニズムに関する洞察を得るために GlcCer と個別の腸内細菌との相互作用を調べた。

【方法および結果】栄養培地に GlcCer(終濃度 40ug/ml)、コール酸ナトリウム(終濃度 0.0015%(w/v))、菌体(終濃度 $1.0\times10^6$cells/ml)を添加後、至適温度で培養した。その後、分光光度計で OD600 値を測定した結果、スフィンゴ脂質を構成因子としてもつ *Sphingomonas* 属や *Blautia coccoides* は有意に増加していたが、一般的な腸内細菌である大腸菌 *E.coli* や腸内優勢菌の Firmicutes 門に属する *Clostridium beijerinckii* や *Clostridium butyricum* には影響しなかった。*B.coccoides* は世界的に見ても日本人の腸内に多く生息し、宿主への健康機能性をもつ事が報告されている。また、薄層クロマトグラフィーを用いることで、*Sphingomonas* 属 5 株との共培養により GlcCer が分解されていたり細胞へ吸着されていることが明らかとなった。これらの影響により GlcCer が腸内細菌の増殖能を上げる可能性が考えられた。さらに、酪酸産生菌 *C.butyricum* に麹 GlcCer を加えると酪酸産生量が増加傾向を示した(T 検定, p=0.075)。酪酸は制御性 T 細胞の分化誘導を活性化することが報告されている。以上の結果より、麹 GlcCer は大腸に到達した後、特定の腸内細菌に吸着して分解され、増殖を刺激し、腸内細菌叢の構成を変化させ、さらに健康機能性を持つ物質の産生量を増加させて健康に寄与している可能性が考えられた。

1) SpringerPlus, 5, 1321 (2016)

glycosylceramide, intestinal microflora, koji

発表責任者：北垣浩志（ktgkhrs@cc.saga-u.ac.jp）

講演番号：3C23p15
講演日時：3 月 19 日 17:50～ C 校舎 23 会場

白麹菌における推定クエン酸輸送体 YhmA と CtpA の機能解析
Characterization of putative citrate transporters YhmA and CtpA in *Aspergillus kawachii*.
○門岡 千尋[1]、泉津 弘佑[2]、奥津 果優[1]、吉﨑 由美子[1]、髙峯 和則[1]、後藤 正利[3]、玉置 尚徳[1]、二神 泰基[1] ([1]鹿大農、[2]滋賀県大、[3]佐賀大農)
○Chihiro KADOOKA[1], Kosuke IZUMITSU[2], Kayu OKUTSU[1], Yumiko YOSHIZAKI[1], Kazunori TAKAMIME[1], Masatoshi GOTO[3], Hisanori TAMAKI[1], Taiki FUTAGAMI[1] ([1]Kagoshima Univ., [2]The Univ. of Shiga Pref., [3]Saga Univ.)

【目的】白麹菌 *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* は焼酎製造に用いられる麹菌であり、清酒や味噌、醤油の製造に用いられる黄麹菌にはない特徴として、菌体外に多量のクエン酸を排出する性質をもつ。クエン酸には、焼酎製造時にもろみの pH を下げて雑菌汚染を防ぐ重要な役割がある。本研究では、白麹菌のクエン酸排出機構の解明を目的として、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の 2 つのクエン酸輸送体 Yhm2（クエン酸-オキソグルタル酸交換輸送体）と Ctp1（クエン酸-リンゴ酸交換輸送体）の白麹菌におけるホモログである YhmA と CtpA の機能解析を行った。
【方法・結果】まず、白麹菌において *yhmA* 遺伝子と *ctpA* 遺伝子の破壊株を構築した。その結果、M 培地において *yhmA* 破壊株のコロニーは形態異常を示し、分生子形成能が低下した。一方、*ctpA* 破壊株は低温培養条件（25℃）において顕著に生育が遅延した。クエン酸高生産条件における菌体量あたりのクエン酸生産量を HPLC により測定した結果、*yhmA* 破壊株は野生株の約 40%、*ctpA* 破壊株は約 60%に低下した。次に、GFP 融合タンパク質を破壊株において発現させたところ、YhmA-GFP と CtpA-GFP はいずれもミトコンドリアに局在することが示された。また、白麹菌の *yhmA* を出芽酵母の *yhm2* 破壊株において発現させたところ、*yhm2* 破壊株の表現型である酢酸を炭素源とする培地での生育遅延が改善したことから、白麹菌の *yhmA* は出芽酵母の *yhm2* の機能を相補することが示された。さらに、白麹菌を宿主として S タグを付加した YhmA と CtpA を Tet-On プロモーター制御下で発現し、タグ精製する系を構築した。精製 YhmA-S、および CtpA-S をリポソームに再構成し、$^{14}$C 標識クエン酸の輸送活性を測定した結果、YhmA-S はオキソグルタル酸、CtpA-S はリンゴ酸を対向基質として用いた際に輸送活性を示した。これらの結果から、YhmA と CtpA はミトコンドリア局在型クエン酸輸送体であり、どちらも白麹菌のクエン酸排出に関与することが示唆された。

*Aspergillus*, citric acid, transporter

発表責任者：二神泰基（futagami@chem.agri.kagoshima-u.ac.jp）

講演番号：3C23p16
講演日時：3 月 19 日 18:05～ C 校舎 23 会場

*Aspergillus luchuensis* によるフェルラ酸脱炭酸反応
Ferulic acid decarboxylation by *Aspergillus luchuensis*
○眞榮田 麻友美[1]、渡嘉敷 正司[2]、渡嘉敷 みどり[2]、後藤 正利[3]、伊藤 進[1]、平良 東紀[1] ([1]琉球大農、[2]石川種麹店、[3]佐賀大農)
○Mayumi Maeda[1], Masashi Tokashiki[2], Midori Tokashiki[2], masatoshi Goto[3], Susumu Ito[1], Toki Taira[1] ([1]Ryukyu Univ., [2]Ishikawatanekojiten, [3]Saga Univ.)

【目的】泡盛古酒の特徴香として知られているバニリンは，泡盛の原料である米から遊離されたフェルラ酸（FA）が醸造中に酵素的に 4-ビニルグアヤコール（4-VG）へ変換され，貯蔵中に非酵素的酸化によって生成されることが知られている。泡盛醸造中の FA から 4-VG への変換は，酵母または乳酸菌等のフェノール酸脱炭酸酵素（PAD）によるものだと考えられてきた。一方，泡盛醸造に用いられる黒麹菌である *Aspergillus luchuensis* var. *awamori* およびその albino mutant である焼酎醸造に用いられる白麹菌 *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* のゲノムに，細菌類および *Candida* 属と相同性のある *pad1*(phenol acid decarboxylase) 候補遺伝子と *Saccharomyces cerevisiae* と相同性のある *pad2* (phenylacrylic acid decarboxylase)候補遺伝子が存在する。我々はこれまでに大腸菌で発現させた *A. luchuensis* 由来のリコンビナント PAD1 が FA の 4-VG への変換を触媒することを明らかにしている。本研究では，*A. luchuensis* のフェルラ酸脱炭酸活性（FAD 活性）の米成分による誘導性と，PAD2 欠損株の FAD 活性を調べた。
【方法】供試菌株として *A. luchuensis* var. *awamori* ISH1 株（以下, ISH1 株）と，*A. luchuensis* mut. *kawachii* のホスト株（*ligD*$^{-}$，*argB*$^{+}$，*sC*$^{-}$）（以下 kawachii_cntl 株）および PAD2 候補遺伝子欠損株（*ligD*$^{-}$，*AKAW08977::argB*，*sC*$^{-}$）（以下，kawachii_⊿AKAW08977 株）を用いた。誘導実験には最少培地に米ぬかと米粉およびそれらの構成成分である FA，グルコース，キシロースおよびアラビノースまたはそれらの各種混合物を添加した培地を用いた。これらの培地で 5 日間培養した ISH1 株を用いた静止菌体反応による FAD 活性を調べた。*pad2* 候補遺伝子の FAD 活性への寄与を調べるために，kawachii_cntl 株と kawachii_⊿AKAW08977 株を終濃度 0.5 mM FA 含有最少培地で培養した菌体の FAD 活性を比較した。FA および 4-VG の定量は RP-HPLC にて行った。
【結果・考察】誘導実験の結果，FAD 活性は 1%米ぬか添加区で最も高く，1 mM FA 添加区は米ぬか添加区の 1/3 程度，米粉，グルコース，キシロース，アラビノース（各 1%）添加区ではほとんど検出されなかった。0.5 mM FA 含有最少培地に上記の糖を添加すると，著しく FAD 活性が低下することが分かった。kawachii_cntl 株と PAD2 破壊株である kawachii_⊿AKAW08977 株のどちらにおいても FAD 活性が検出され, その活性は同定であったことから PAD2 は FAD 活性に関与していないことが示唆された。これらの結果から，泡盛醸造中の FA から 4-VG への変換の一部は泡盛麹菌の持つ PAD1 によって行われ，その発現制御は原料米の各種成分により厳密に制御されている可能性が示唆された。

*Aspergillus luchuensis*, Phenolic acid decarboxylase, Awamori

発表責任者：平良東紀（tokey@agr.u-ryukyu.ac.jp）

講演番号：3C24a01
講演日時：3 月 19 日 09:20～ C 校舎 24 会場

キノール酸化酵素の欠失が *Corynebacterium glutamicum* のグルタミン酸生産に与える影響
Effects of disruption of quinol-oxidizing enzymes on glutamic acid production in *Corynebacterium glutamicum*

○片岡 尚也[1,2,3]、那須 裕介[2]、藥師 寿治[1,2,3]、和田 大[4]、横田 篤[4]、松下 一信[1,2,3]（[1]山口大院創成科学、[2]山口大農、[3]山口大中高温微生物セ、[4]北大院農）
○Naoya KATAOKA[1,2,3], Yusuke NASU[2], Toshiharu YAKUSHI[1,2,3], Masaru WADA[4], Atsushi YOKOTA[4], Kazunobu MATSUSHITA[1,2,3] ([1]Yamaguchi Univ., [2]Yamaguchi Univ. Agr., [3]Yamaguchi Univ. RCTMR, [4]Hokkaido Univ.)

【背景・目的】*Corynebacterium glutamicum* は，グルタミン酸の工業的発酵生産に用いられている産業微生物である。*C. glutamicum* によるグルタミン酸発酵は，好気培養条件で行われており，必要となるエネルギーは主に呼吸鎖電子伝達系によって獲得されている。しかしながら，呼吸鎖とグルタミン酸生産の関連については，神崎らの銅イオン添加による酢酸からのグルタミン酸生産の活性化は報告されている (1) ものの未だ不明な点が多い。本研究では，*C. glutamicum* の呼吸鎖の中でもプロトン駆動力形成への関与が大きいと考えられるキノール酸化酵素 (シトクロム $bc_1$-$aa_3$ 超複合体 (Cyt$bc_1$-$aa_3$), シトクロム *bd* 型酸化酵素 (Cyt*bd*)) に焦点を当て，これらのグルタミン酸生産への寄与を解析した。
【方法】*C. glutamicum* ATCC 13032 株を親株として，各キノール酸化酵素の機能を欠失させる変異を二重相同組換え法によって導入した。得られた株 (ΔCyt$bc_1$ , ΔCyt*bd*) を，ビオチン量を制限したグルタミン酸発酵条件下で 2 L ジャーファーメンターを用いて培養し，その発酵特性について解析した。また，特徴的な表現型の違いが見られた ΔCyt$bc_1$ 株においては，ビオチン添加量を枯渇させるとともに初期植菌量を低下させた条件下でも培養し，同様に解析した。
【結果】通常のグルタミン酸発酵条件において ΔCyt*bd* 株は親株と同等のグルタミン酸を生産したが，ΔCyt$bc_1$ 株ではグルタミン酸は生産されず，代わりに，乳酸，コハク酸，酢酸，ピルビン酸といった有機酸が発酵培地中に顕著に蓄積された。これは，通常のグルタミン酸発酵条件では，キノール酸化は主に Cyt$bc_1$-$aa_3$ により行われており，Cyt*bd* の寄与は小さい，またはほとんど無いことを示唆していた。また，ΔCyt$bc_1$ 株では，菌体当たりの糖消費速度が上昇しており，これは，*C. glutamicum* ATCC 14067 株を親株に取得された $F_oF_1$-ATP 合成酵素活性低下株 (F172-8 株) でも観察されていた (2) ことから，ここで見られた変化は，Cyt$bc_1$ 機能の欠失に伴う酸化的リン酸化の抑制によるものであると考えられた。F172-8 株は，ビオチン添加量の枯渇と初期植菌量の低下によりグルタミン酸生産の復帰が見られていた (3) ため，同様の方法で ΔCyt$bc_1$ 株を解析したところ，グルタミン酸生産が復帰した。現在，グルタミン酸生産の復帰の原因について詳細な解析を進めている。

(1) Kanzaki T, *et al.*, *Agr. Biol. Chem.*, **37**: 1407-1416. (1973)
(2) Sekine H, *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **57**: 534-540. (2001)
(3) Aoki R, *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**: 1466-1472. (2005)

*Corynebacterium glutamicum*, Glutamic acid production, Quinol-oxidizing enzyme

発表責任者：片岡 尚也（nkataoka@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：3C24a02
講演日時：3 月 19 日 09:35～ C 校舎 24 会場

酢酸菌 *Gluconobacter thailandicus* におけるジヒドロキシアセトン・リン酸化酵素の遺伝学的・生化学的解析

Genetic and biochemical study on dihydroxyacetone kinases in *Gluconobacter thailandicus*

平田 花織[1]、松谷 峰之介[2]、足立 収生[1,2]、片岡 尚也[1,2,3]、○薬師 寿治[1,2,3]、松下 一信[1,2,3] ([1]山口大・農、[2]山口大・院創科、[3]山口大・微研セ)

Kaori HIRATA[1], Minenosuke MATSUTANI[2], Osao ADACHI[1,2], Naoya KATAOKA[1,2,3], ○Toshiharu YAKUSHI[1,2,3], Kazunobu MATSUSHITA[1,2,3] ([1]Fac. Agr., Yamaguchi Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Tech., Yamaguchi Univ., [3]RCTMR, Yamaguchi Univ.)

*Gluconobacter* 属酢酸菌はペリプラズムにあるキノプロテイン・グリセロール脱水素酵素（GLDH）によってグリセロールを酸化し，ジヒドロキシアセトン（DHA）へと変換，蓄積することができる。*Gluconobacter thailandicus* NBRC 3255 は，生産された DHA をほぼ完全に消費する。微生物による DHA の工業的生産を考えると，DHA を消費しない方が好ましい。その一方で，*Gluconobacter* 属酢酸菌における DHA 代謝やその制御に関する知見は乏しい。私たちは，*G. thailandicus* NBRC 3255 株の DHA 代謝に関する解析を進めている。昨年度の本大会で，NBRC 3255 株における DHA の細胞内代謝は DHA リン酸化酵素(DHAK)に依存していることを提唱した。

NBRC 3255 株のドラフトゲノム解析から，DHAK をコードすると考えられる遺伝子が 2 つ(*NBRC3255_2003* と *NBRC3255_3084*)見いだされる。これらは互いにホモログの関係にあり，カバー率 99%で同一性 24%，類似性 65%である。生化学的に解析された *Citorobacter freundii* の DHAK や他の酢酸菌の DHAK 遺伝子と共に系統解析を行うと，２つのクラスターに分かれた。酢酸菌に広く見られる方(NBRC3255_3084)を DHAK1，*C. freundii* の DHAK と同じクラスターの方（NBRC3255_2003）を DHAK2 と名付けた。しかし，*dhaK1* と *dhaK2* 遺伝子を両方とも破壊しても，DHAK 活性や DHA 消費にほとんど影響がなかった。

そこで,この二重破壊株の可溶性画分から DHAK を精製した。N 末端アミノ酸配列を解析したところ，グリセロールキナーゼ(NBRC3255_0851，GlpK)と一致した。実際，この部分精製標品は DHA だけでなくグリセロールもリン酸化した。*glpK* 遺伝子の破壊株を作製したところ，DHAK 活性が野生株の 10%程度にまで低下し，グリセロールキナーゼ活性は検出できなかった。しかし，遅れはするものの，*glpK* 破壊株は DHA をほぼ完全に消費した。

*glpK* 破壊株に見られた弱い DHAK 活性が DHA 代謝に関与していると考えられたため，Δ*dhaK1* 株とΔ*dhaK2* 株の *glpK* 遺伝子を破壊し，二重遺伝子破壊株をそれぞれ作製した。Δ*dhaK1* Δ*glpK* 株は，DHAK 活性を検出できず，グリセロールのみを炭素源とする培地で生育できなかった。また，グルコースとグリセロールの２つを炭素源として生育させると，DHA の蓄積が見られた。一方，Δ*dhaK2*Δ*glpK* 株は，DHAK 活性とグリセロール培地での挙動において，Δ*glpK* 株に似ていた。以上から，*G. thailandicus* NBRC 3255 株の DHA 代謝には DHAK1 と GlpK が重要な役割を演じていることが明らかとなった。どちらか一方を阻害しても DHA 代謝を行うことができるが，両方を阻害するとその能力を大きく失ってしまう。

*Gluconobacter*, dihydroxyacetone, kinase

発表責任者：薬師寿治（juji@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：3C24a03
講演日時：3 月 19 日 09:50～ C 校舎 24 会場

*Gluconobacter* 属酢酸菌キノプロテイン・グリセロール脱水素酵素における新たな基質の発見とその反応メカニズムの提唱

Finding on new substrate specificity and reaction mechanism of PQQ-dependent glycerol dehydrogenase in *Gluconobacter sp.*

○寺田 優花[1]、尾崎 聖士朗[2]、片岡 尚也[1,2,3]、足立 収生[1,2]、赤壁 善彦[1,2]、藥師 寿治[1,2,3]、松下 一信[1,2,3] ([1]山口大・院創科、[2]山口大・農、[3]山口大・微研セ)

○ Yuka TERADA[1], Seishiro OZAKI[2], Naoya KATAOKA[1,2,3], Osao ADACHI[1,2], Yoshihiko AKAKABE[1,2], Toshiharu YAKUSHI[1,2,3], Kazunobu MATSUSHITA[1,2,3] ([1]Gard. Sch. Sci. Tech. Yamaguchi Univ., [2]Fac. Agr. Yamaguchi Univ., [3]RCTMR Yamaguchi Univ.)

【背景・目的】*Gluconobacter* 属酢酸菌は細胞質膜のペリプラズム側に多種多様な膜結合型脱水素酵素を保有しており、様々な糖や糖アルコールを不完全に酸化するというユニークな特徴がある。なかでもキノプロテイン・グリセロール脱水素酵素（GLDH）は広範囲な基質を酸化し、その酸化反応の 1 つはビタミン C 生産に用いられるソルボース発酵として良く知られている。GLDH は第 2 級アルコールを酸化してケトンを生じる反応を触媒する。グリセロール、D-ソルビトール、D-マンニトールなどを酸化し、ジヒドロキシアセトン、L-ソルボース、D-フルクトースをそれぞれ生じる。基質の構造上の共通点は、第 1 級アルコールの隣にある 2 つの水酸基がエリスロ配置である糖アルコールであり、GLDH はその 2 位の水酸基を酸化する。しかしミュンヘン工科大学の Peters らは、この法則に従わない構造をもつ D-リキソース が、*Gluconobacter oxydans* 621H 株の GLDH によって酸化されることを報告した（1)。そこで、本研究では GLDH の基質特異性を見直すことからはじめた。

【方法・結果】タイで分離された耐熱性 *Gluconobacter frateurii* CHM43 株と、その GLDH 欠損株の 2 菌株の膜画分を用い、いくつかの糖アルコール、アルドース、ケトースの酸化活性を測定して GLDH の基質特異性を調べた。その結果、GLDH が L-タガトース、D-及び L-リキソース、D-及び L-リボースに対して酸化活性を持つことが示された。したがって、法則に従わない構造である D-タガトースと L-リキソース、L-リボースが新たに GLDH の基質であることが示された。また、膜画分と L-リボースを反応させた溶液を調べた結果、L-リボースの消費と L-リボース酸化物とみられる物質の蓄積が確認された。この時、経時的な pH 低下も認められた。L-リボース酸化物の精製を行い、MS、NMR 解析によって構造を決定したところ、L-リボン酸であることが判明した。したがって、GLDH が環状 L-リボースの 1 位の水酸基を酸化して L-リボノラクトンを生成し、これが非酵素的に加水開環してカルボキシ基を持つ L-リボン酸へ変化したと考えた。これに従い、環状 L-リボースと似た構造を持つ環状 D-リキソースも同様の反応が進んだと考えられ、その酸化物は D-リキソン酸であると推測された。

1. Peters, B., *et al.*, 2013. Characterization of membrane-bound dehydrogenases from *Gluconobacter oxydans* 621H via whole-cell activity assays using multideletion strains. Appl Microbiol Biotechnol. 97(14), 6397-412.

PQQ-dependent glycerol dehydrogenase, *Gluconobacter*, ribonate

講演番号：3C24a04
講演日時：3 月 19 日 10:05～ C 校舎 24 会場

# *Gluconobacter frateurii* CHM43 高温適応育種株の耐熱化機構の解析

# Analysis of thermotolerant mechanism in thermally adapted *Gluconobacter frateurii* CHM43

○松本 奈実[1]、服部 浩美[1]、松谷 峰之介[1]、外山 博英[2]、片岡 尚也[1,3]、藥師 寿治[1,3]、松下 一信[1,3] ([1]山口大院創成科学、[2]琉球大院農、[3]山口大中高温微セ)
○Nami MATSUMOTO[1], Hiromi HATTORI[1], Minenosuke MATSUTANI[1], Hirohide TOYAMA[2], Naoya KATAOKA[1,3], Toshiharu YAKUSHI[1,3], Kazunobu MATSUSHITA[1,3] ([1]Yamaguchi Univ., [2]Univ. of Ryukyus, [3]Yamaguchi Univ. RCTMR)

酢酸菌は糖やアルコールを細胞膜にある膜結合型酵素によって酸化する能力を持ち、培地中に生産物を蓄積するため食酢の醸造やソルボース発酵、ケトグルコン酸発酵に用いられている。これらの発酵は通常 32℃以下で行われているが、発酵時の温度上昇を制御する冷却システムに多大な費用が掛かっているため、冷却コスト削減に貢献できる耐熱性を有する菌株の開発が望まれている。ソルボース発酵株である *Gluconobacter frateurii* CHM43 を生育限界温度の高温で繰り返し培養をする高温適応育種によって、より高温(38.5～40℃)で生育およびソルボース生産の可能な菌株が得られた[1]。本研究は、その耐熱化機構の知見を得ることを目的としている。

耐熱化株の変異箇所を同定する為に、親株との比較ゲノム解析を行ったところ、耐熱化株では 12 回膜貫通型の multidrug transporter に一塩基挿入によるフレームシフト変異が入っていることが分かった。そこで、CHM43 株を用いて耐熱化株と同じ変異を持つ一塩基挿入変異株および遺伝子破壊株を構築し、生育比較を行うことで、この単一遺伝子の変異が耐熱化に必要十分である事を明らかにした。次に、耐熱化株の生理学的特徴を理解する為に、その生化学的解析と RNA-seq 解析を行った。親株 CHM43 と耐熱化株に過酸化水素耐性の差はみられなかったが、耐熱化株の高温下(37, 38.5℃)における ROS レベルは、親株に比べて著しく減少していた。そこで、ROS 除去系酵素のうちカタラーゼおよび SOD 活性を両株間で比較したが、カタラーゼ活性に差異はなく、膜画分の SOD 活性だけが耐熱化株で増加していた。RNA-seq による発現解析では、カタラーゼおよび Mn-SOD 遺伝子の発現量は CHM43 と耐熱株で差は見られなかったが、耐熱化株で Cu/Zn-SOD 遺伝子の発現が高温で増加していた。その他にいくつかの ROS 除去系酵素遺伝子が両株とも高温下で発現上昇がみられた。

代謝系遺伝子群の発現を調べると、EMP 系および TCA 経路関連酵素遺伝子の変動は両株とも見られなかったが、ペントースリン酸経路酵素オペロンは両株とも高温下で発現上昇が特徴的にみられた。さらにソルボース発酵に関連する呼吸鎖酵素（グリセロール脱水素酵素および $bo_3$ 末端オキシダーゼ）各オペロンの高発現と高温下での発現上昇がみられた。このことから、呼吸によるエネルギー生成と生じた ROS の効率的な処理によって、高温での生育を可能にしている可能性が示唆された。現在、酸化ストレス耐性と耐熱性との関連性についてさらなる解析を行っている。

本研究は JST-ALCA 事業の一環である。

[1] Hattori H, et al., *Appl Microbiol Biotechnol.*, **95**: 1531 (2012)

*Gluconobacter*, thermotolerant, multidrug transporter

講演番号：3C24a05
講演日時：3 月 19 日 10:20～ C 校舎 24 会場

プロリン蓄積によりストレス耐性が向上したパン酵母変異株の分離と特性解析
Isolation of baker's yeast mutants with proline accumulation that showed enhanced tolerance to baking-associated stresses
Tsolmonbaatar Ariunzaya[1]、橋田 恵介[1]、杉本 幸子[1]、渡辺 大輔[1]、古川 周平[2]、○高木 博史[1]（[1]奈良先端大バイオ、[2]オリエンタル酵母工業）
Ariunzaya Tsolmonbaatar[1], Keisuke Hashida[1], Yukiko Sugimoto[1], Daisuke Watanabe[1], Shuhei Furukawa[2], ○Hiroshi Takagi[1] ([1]Nara Inst. of Sci. Tech., [2]Oriental Yeast Co., Ltd.)

【背景と目的】当研究室では、実験室酵母を用いてアミノ酸の代謝制御や生理機能に着目したストレス耐性機構を解析し、産業酵母の育種に応用することを目指している。現在までに、プロリンによる細胞保護効果や、プロリン・アルギニン代謝を介した一酸化窒素（NO）の合成亢進による新規なストレス耐性機構を見出している。また、セルフクローニング法によってプロリンまたは NO の合成系を強化したパン酵母が、製パン過程における様々なストレス（冷凍、乾燥、高ショ糖）下において、良好な製パン特性を示すことを報告している。しかし、遺伝子組換え技術に対する社会的受容性が低いため、このような酵母の実用化は未だに困難な状況にある。そこで、本研究では非遺伝子組換え技術に基づく古典的な育種法によってプロリンやアルギニンを蓄積するパン酵母の変異株を取得するとともに、それらのストレス耐性や製パン性の評価を行うことを目的とした。
【方法と結果】エチルメタンスルホン酸処理によって実用パン酵母（親株）に突然変異を導入し、プロリンまたはアルギニンの毒性アナログ（アゼチジン-2-カルボン酸（AZC）またはカナバニン（Can））に対して耐性を示す変異株を単離した。得られた変異株の中から、親株よりプロリン含量が最大で約 9 倍に、アルギニン含量が最大で約 3 倍にそれぞれ増加した変異株を選抜した。また、製パン関連ストレス（冷凍，高ショ糖）に対して、親株より高い耐性を示す変異株を複数取得した。そこで、プロリン、アルギニンを蓄積するパン酵母の変異株（10 株）について、ストレス耐性や製パン性を評価した。その結果、高糖生地では 5 株の発酵力が親株に比べて有意に高く（最高で約 60%向上）、高ショ糖耐性の向上も確認できた。また、上記の 5 株は 7 日間凍結後に解凍した冷凍生地での発酵力も親株に比べて高い傾向を示した（最高で約 30%向上）。これらの変異株では、30 日間凍結後に解凍した冷凍生地での発酵力と冷凍初期の発酵力を比較した残存活性も高く、冷凍耐性の向上が確認できた。さらに、各変異株の遺伝子を解析した結果、2 株でプロリン合成の鍵酵素 γ-グルタミルキナーゼ（GK）をコードする *PRO1* 遺伝子に新規なアミノ酸置換（Pro247Ser, Glu415Lys）を伴う変異を見出した。各 GK 変異体をパン酵母で発現させると、細胞内プロリン含量が野生型 GK 発現株の約 2 倍に増加し、GK 変異体ではプロリンによるフィードバック阻害感受性が低下していた。また、GK 変異体発現株では、冷凍後の細胞生存率が野生型 GK 発現株の約 2-3 倍に増加していた。以上の結果から、プロリンアナログ耐性変異株の取得がパン酵母の育種に有効であることが実証できた（*Int. J. Food Microbiol.*, **238**, 233-240, 2016）。

baker's yeast, proline accumulation, stress tolerance

発表責任者：高木博史（hiro@bs.naist.jp）

講演番号：3C24a06
講演日時：3 月 19 日 10:45～ C 校舎 24 会場

# 実用酵母中心代謝の比較プロテオミクス

# Comparative proteomics of industrial diploid yeasts

植林 希代加、○松田 史生、清水 浩（阪大情報）
Kiyoka Uebayashi, ○Fumio Matsuda, Hiroshi Shimizu (Osaka Univ.)

【目的】出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* には用途ごとに特性の異なる実用株が存在し、中心代謝機能が株間差に深く関与していると推測される。そこで、本研究では実験室酵母、パン酵母、ワイン酵母、醸造用協会酵母に注目し、最小培地での培養特性を比較した。さらに定量プロテオーム解析法を用いて、中心代謝酵素発現プロファイルを取得し、実用株間での比較解析を試みた。
【方法と結果】4 種の *S. cerevisiae* 二倍体株（BY4947, 協会 7 号, Red Star, QA23）を 50 mL の SD 培地で培養した（30 ℃, 120 rpm, n = 3）。その結果、実験室酵母 S288C 由来の二倍体株である BY4947 の比増殖速度 ($0.327 \pm 0.002\ h^{-1}$) に比べ、協会 7 号（日本酒）、Red Star（パン）、QA23（ワイン）ではそれぞれ 17, 12, 5%増加していた。一方、RedStar では BY4947 に比べて、グルコース比消費速度、エタノール比生産速度ともに 20%以上増加したが、QA23 では逆に低下していた。以上の結果から、最小培地において実用株の培養特性は大きく異なることが明らかとなった。

ついで対数増殖期（$OD_{600}$ = 1.2-1.7）で集菌した菌体からタンパク質を抽出し (n = 3)、トリプシン消化したペプチドサンプルを調製した。これを nano LC-MS/MS (島津製作所 LC-20ADnano + LCMS-8040) の SRM アッセイ法を用いたターゲットプロテオーム解析に供し、中心代謝酵素タンパク 105 種の相対定量に成功した。全データを用いて主成分分析を行ったところ 4 株が別個のクラスターに分かれたことから、代謝酵素発現プロファイルに変化があることが示唆された。酵素発現プロファイルの比較から、Red Star ではペントースリン酸経路の Rki1p の発現量が BY4947 に比べて 45%増加し、エタノール生合成経路の Pdc1p の発現が 15%低下していた。この結果からパン酵母の RedStar では、酵素発現プロファイルがエタノール発酵から菌体増殖へとシフトしたことで、培養挙動が変化したと推測された。また QA23 では解糖系酵素の発現量が全体的に低下していたことが、エタノール比生産速度の低下に関与していると推測された。

Saccharomyces cerevisiae, Proteomics, Central metabolism

発表責任者：松田史生（fmatsuda@ist.osaka-u.ac.jp）

講演番号：3C24a07
講演日時：3 月 19 日 11:00～ C 校舎 24 会場

TCA 回路酵素遺伝子過剰発現が *Mortierella alpina* の脂質生産性に及ぼす影響
The effect of TCA cycle enzyme over-expressing for lipid-productivity in *Mortierella alpina*
○島田 良美[1]、安藤 晃規[1]、和泉 自泰[2]、馬場 健史[2]、岸野 重信[1]、櫻谷 英治[3]、島 純[4]、小川 順[1] ([1]京大院・農、[2]九大・生医研、[3]徳島大・生物資源、[4]龍谷大・農)
○Yoshimi Shimada[1], Akinori Ando[1], Yoshihiro Izumi[2], Takeshi Bamba[2], Shigenobu Kishino[1], Eiji Sakuradani[3], Jun Shima[4], Jun Ogawa[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Med. Inst. Bioreg., Kyusyu Univ., [3]Fac. Biosci. Bioind., Tokushima Univ., [4]Fac. Agric., Ryukoku Univ.)

【緒言】

当研究室で分離した糸状菌 *Mortierella alpina* 1S-4 株は、細胞内に脂質を高蓄積する油糧微生物で、アラキドン酸生産菌として工業的に利用されている。我々はこれまでに、本菌株の代謝プロファイリングにより、脂質蓄積時において TCA 回路におけるクエン酸やリンゴ酸産生のフラックスが上昇することを見出した[1)]。またこの成果に基づき、TCA 回路関連酵素を過剰発現した株を構築したところ、脂質生産性が向上することを報告した[2)]。本研究ではこれらの過剰発現株の脂質生産性について、さらなる検討を行った。

【方法および結果】

*M. alpina* において、アコニターゼ(ACO)遺伝子およびイソクエン酸デヒドロゲナーゼ(IDH)の過剰発現株を作成したところ、脂質生産性の向上が認められた。そこで、コントロール株および過剰発現株を用いて、菌体生育量、グルコース消費量、窒素消費量、脂質生産性について経時的変化を測定した。その結果、培養初期においては、コントロール株に比べて形質転換株の生育が良好であり、この時期に脂質生産性が上昇することがわかった。

【参考】

1） 和泉自泰ら,「油糧微生物 *Mortierella alpina* のメタボローム解析」, 第 9 回メタボロームシンポジウム, 0-41, 2015 年 10 月静岡
2） 島田良美ら,「TCA 回路酵素遺伝子過剰発現による *Mortierella alpina* の脂質生産性向上の検討」, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 3F161, 2016 年 3 月北海道

*Mortierella alpina*, lipid production, TCA cycle

発表責任者：小川　順（ogawa@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3C24a08
講演日時：3 月 19 日 11:15～ C 校舎 24 会場

*Euglena gracilis* のワックスエステル発酵阻害による蓄積代謝物の変換
Modification of metabolic behavior by inhibiting wax ester fermentation in *Euglena gracilis*
○中本 雅俊[1,3]、金谷 重彦[1]、有田 正規[2]、太田 大策[3]([1]奈良先端情報、[2]国立遺伝学研究所、[3]大府大生命)
○Masatoshi Nakamoto[1,3], Shigehiko Kanaya[1], Masanori Arita[2], Daisaku Ohta[3] ([1]NAIST, [2]NIG, [3]Osaka Pref. Univ.)

*Euglena gracilis* は鞭毛を有することにより高い運動性を持つが，細胞内に葉緑体を有しており，光合成をおこなうことにより独立栄養的に生育することが可能な真核単細胞生物である．*E. gracilis* は明条件下で好気的に培養することにより，大気中の $CO_2$ を固定し，細胞内に貯蔵多糖パラミロン（β-1,3 グルカン）を大量に蓄積する．培養環境を好気的環境から嫌気的環境に移行させると，パラミロンの加水分解と解糖系を経て，脂肪酸と脂肪族アルコールがエステル結合したワックスエステル（WE）が合成される（WE 発酵）．*E. gracilis* の WE は工業原料としての利用価値が高く，WE 合成能の強化を目的とした研究が精力的に行われている．我々は WE 発酵を阻害することにより貯蔵多糖パラミロンから有用物質を生産することを目的として，WE 発酵阻害剤のスクリーニングを実施した．スクリーニングにはナフタレン類，アントラキノン類，安息香酸，インドール化合物などを含む，426 種類の化合物を用いた．明所・振盪培養（好気条件）で 4 日間培養した *E. gracilis* を，密封した 96 well plate 中で 24 時間静置培養（嫌気条件）することにより WE 発酵を誘導した．WE は中性脂質の染色試薬（蛍光色素）である Nile Red と BODIPY 493/503 で染色し，plate reader により検出された蛍光強度と蛍光顕微鏡観察により WE 蓄積阻害を評価した．また，候補化合物処理による *E. gracilis* の生死確認を Methylene blue 染色により行った．蛍光強度に変化が認められ，なおかつ化合物処理後に生存が確認された 10 種類の化合物を特定した．これらの化合物を処理した *E. gracilis* の WE 蓄積量を GC-MS により分析・評価し，実際に WE 蓄積量の減少が認められた試験区に対して代謝物の分析を行った．その結果，TCA 回路のクエン酸およびリンゴ酸の蓄積量が増加した化合物や，アラニンの蓄積量の増加が認められた化合物を獲得した．今回，これらの化合物の処理によって誘導される細胞内に蓄積された代謝物および培地中に放出された代謝物の分析結果について報告する．

*Euglena gracilis*, wax ester, metabolite

講演番号：3C24a09
講演日時：3 月 19 日 11:30～ C 校舎 24 会場

ラビリンチュラ類 *Aurantiochytrium* 属のメタボローム解析による育種標的の探索と脂質生産量の向上

Exploring of targets to improve the lipid productivity of marine oleaginous microorganism, *Aurantiochytrium* sp. by metabolomic analysis.

○渡邉 研志[1,3]、Arafiles Kim[1,3]、岡村 好子[1,3]、田島 誉久[1,3]、松村 幸彦[2,3]、中島田 豊[1,3]、秋 庸裕[1,3] ([1]広島大院・先端研、[2]広島大院・工、[3]JST・CREST)

○ Kenshi WATANABE[1,3], Kim ARAFILES[1,3], Yoshiko OKAMURA[1,3], Takahisa TAJIMA[1,3], Yukihiko MATSUMURA[2,3], Yutaka NAKASHIMADA[1,3], Tsunehiro AKI[1,3] ([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Hiroshima Univ., [3]JST・CREST)

【目的】ラビリンチュラ類 *Aurantiochytrium* 属は高度不飽和脂肪酸、炭化水素、カロテノイドなどの高機能性脂質を著量蓄積する海洋性真核微生物であり、魚油や植物油に代わる高機能性脂質の新たな供給源として期待される。演者らは本微生物による高機能性脂質の安価かつ持続的な供給を実現するために、海洋及び陸上の余剰・非可食バイオマスや産業廃棄物系バイオマスの培養基質としての利用を試みている。脂質収量の最大化のためには各種バイオマスの多種多様な組成物が *Aurantiochytrium* の代謝に与える影響の把握と、それに応じた分子育種や培養条件の至適化が必要となる。本研究では、異なる培養環境が *Aurantiochytrium* 属の代謝に及ぼす影響をメタボローム解析によって包括的に観察して育種標的を探索し、得られたメタボローム情報に基づいた培養条件の至適化により脂質生産効率の向上を試みた。

【方法及び結果】演者らはこれまでに、豊富な海洋性バイオマスである褐藻から抽出したマンニトールを酢酸菌 *Gluconobacter* によってフルクトースへ変換し、ドコサヘキサエン酸高生産性の *Aurantiochytrium* sp. CB15-5 株による油脂発酵に利用する二段階培養系を開発してきたが、グルコースを炭素源とした場合と比較して油脂生産量が低下していた。そこで、グルコースまたはフルクトースを単一炭素源として培養した *Aurantiochytrium* の油脂生産量を比較したところ、フルクトース培養によって細胞当たりの主要脂肪酸生産量の低下が認められた。細胞内の親水性代謝物をメタノール/水/クロロホルム混合溶液により抽出し、ガスクロマトグラフ及び高速液体クロマトグラフ質量分析によって代謝物の同定と相対定量解析を行った結果、フルクトース培養ではリンゴ酸などの TCA 回路関連物質の細胞内濃度に顕著な低下が認められ、同回路の抑制が脂肪酸生合成系に影響を及ぼしていることが推定された。現在は TCA 回路活性化を含めた脂質生産量の向上に向けた培養条件の検討と、それに伴う代謝変動の解析を進めており、その詳細について報告する。

metabolomics, lipid production, *Aurantiochytrium*

発表責任者：秋　庸裕（aki@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：3C24p02
講演日時：3 月 19 日 14:15～ C 校舎 24 会場

油糧微生物 *Mortierella alpina* 1S-4 株の分子育種に有用なプロモーターの探索および評価
Selection and characterization of promoters for the molecular breeding of oleaginous fungus *Mortierella alpina* 1S-4

○奥田 知生[1]、安藤 晃規[1]、櫻谷 英治[1,2]、鎌田 望[3]、落合 美佐[3]、小川 順[1]([1]京大院・農、[2]徳島大院・生物資源産業、[3]サントリーグローバルイノベーションセンター)
○Tomoyo Okuda[1], Akinori Ando[1], Eiji Sakuradani[1,2], Nozomu Kamada[3], Misa Ochiai[3], Jun Ogawa[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Inst. Technol. Sci., Univ. Tokushima, [3]Suntory Global Innovation Center Ltd.)

【背景】

*Mortierella alpina* 1S-4 株は長鎖多価不飽和脂肪酸（PUFA）を著量蓄積する油糧微生物である。我々の研究室ではこれまでに、1S-4 株の分子育種法を開発し、脂肪酸生合成経路を改変することにより、種々の機能性 PUFA 生産を実現してきた。しかしながら 1S-4 株の分子育種ツールは未だ充分に整備されているとは言えず、自由な遺伝子改変には課題が残っている。そのひとつとして、遺伝子発現系に利用可能なプロモーターの種類の少なさが挙げられる。

本研究では、1S-4 株の分子育種に有用なプロモーターの取得を目的とし、本株におけるプロモーター評価系の確立、および、確立した評価系を用いたプロモーター探索と機能評価を行なった。

【方法と結果】

まず、*Escherichia coli* 由来 β-glucuronidase（GUS）遺伝子をレポーターとするプロモーター評価用ベクターを構築し、*M. alpina* 1S-4 ウラシル要求性変異株にアグロバクテリウム法にて導入した。得られた形質転換体における GUS 活性値を、4-nitrophenyl-β-D-glucuronide を基質とする酵素アッセイによって定量的かつ再現性良く測定できることを確認した。

続いて、1S-4 株のゲノム情報及び EST 解析結果をもとに、約 30 種類の有用プロモーター候補を選抜し、上述の評価系を用いて活性を評価した。その結果、従来のプロモーターの約 5 倍の活性を示す高発現プロモーター、時期特異的発現プロモーター等、分子育種に有用と考えられる特徴を示す新規プロモーターを多数見いだした。

*Mortierella alpina*, promoter, oleaginous fungus

発表責任者：小川順（ogawa@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3C24p03
講演日時：3 月 19 日 14:30～ C 校舎 24 会場

麹菌 *Aspergillus oryzae* 酸性プロテアーゼ欠損株の転写解析
Transcriptional analysis in *Aspergillus oryzae* acidic proteases deletion strains
○佐藤 栄里、前田 浩、上野 絢子、竹内 道雄、山形 洋平（東京農工大農）
○Eri SATO, Hiroshi MAEDA, Ayako UENO, Michio TAKEUCHI, Youhei YAMAGATA (Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

【背景・目的】黄麹菌 *A. oryzae* は酸性下で作用するプロテアーゼの遺伝子を比較的多く持ち、それにはアスパルティックプロテアーゼ（ APase ）、ペプスタチン非感受性プロテアーゼ（ PIP ）、セリンタイプカルボキシペプチダーゼ（ セリンタイプ CPase ）、アオルシン（ Aorsin ）、ジペプチジルペプチダーゼが含まれる。これらのうち、菌体外分泌型であるものが、APase：AP4, PepO, AP6, AP9, AP11、PIP：PIPA, PIPB、CPase：TA4, OcpO、Aorsin：aorA, aorB である。APase は全て mRNA として転写されているが、このうちタンパク質として分泌されるのは菌体外分泌酵素の一つである PepO のみであることが確認された。唯一分泌される PepO が欠損したらどのような現象が起こるのか確認するため、*pepO* 遺伝子欠損株（*Δpep*O）を作製し、カゼイン分解活性測定を行ったところ、酸性下で作用するエンド型プロテアーゼ aorsinA の活性が確認された。*ΔpepOΔaorA* 株を作製すると、カルボキシペプチダーゼ（CPase）の活性が上昇していた。更に *ΔocpO* 株、*ΔpepOΔocpO* 株を作製され、カゼイン分解活性、CPase 活性、aorsin 活性が調べられている。以上の結果をもとに、本研究では *ΔpepO* 株、*ΔocpO* 株、*ΔpepOΔocpO* 株の転写解析を行い、活性測定結果と比較して作用するプロテアーゼの詳細を調べ、その欠損が及ぼす影響について調べることを目的とした。
【方法・結果】*ΔpepO* 株、*ΔocpO* 株、*ΔpepOΔocpO* 株、また NS4 及び RIB40 を、窒素源を大豆タンパク質にした Czapek Dox 液体培地を用いて 30℃で 24, 36 時間振とう培養し、培養上清と分離した菌体から total RNA を抽出し、cDNA を合成した後、*ap4, ap5, ap6, ap9, ap11, TA4, TA13, pipA, pipC, aorA, aorB* について定量 PCR により転写解析を行った。RIB40 と比較したところ、遺伝子によっては活性測定結果とは異なる増減の変化が見られた。まず、*pepO (ap5)* パラログである *ap4* について 24 時間培養の *ΔpepO* 株、*ΔpepOΔocpO* 株のカゼイン分解活性は減少しているが、転写量は増加していた。また、*ap11* について 36 時間培養の *ΔocpO* 株のカゼイン分解活性は変化がなかったが、転写量は減少していた。*ocpO* のパラログである *TA4* については 24 時間培養の各欠損株、36 時間培養の *ΔpepO* 株の CPase 活性測定結果と転写量の結果は異なっていた。*aorA* については 36 時間培養の *ΔpepO* 株の aorsinA 活性は増加しているが、転写量は変化していなかった。aorB については 36 時間培養の *ΔocpO* 株、24・36 時間培養の *ΔpepOΔocpO* 株の aorsinB 活性は増加しているが、転写量は減少していた。

*Aspergillus oryzae*, acidic protease, transcription

発表責任者：山形洋平（y-yama@cc.tuat.ac.jp）

講演番号：3C24p04
講演日時：3 月 19 日 14:45～ C 校舎 24 会場

# 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* pepstatin insensitive protease のプロモーター領域の解析

Analysis of promoter region in *Aspergillus oryzae* pepstatin insensitive protease

○関 桃子、竹内 真理衣、山形 洋平（農工大）
○Momoko Seki, Marii Takeuchi, Youhei Yamagata (Tokyo Univ. agriculture and technology)

【目的】

pepstatin insensitive protease(PIP)は酸性領域で作用するエンドペプチダーゼであるが、アスパルティックプロテアーゼの特異的阻害剤であるペプスタチンによっては阻害を受けず、グルタミン酸を活性中心に持つという特徴がある。我々は、*A.oryzae* RIB40 が PIP の活性中心モチーフを保存するタンパク質をコードする 3 つの遺伝子 *pipA, pipB, pipC* を保有することを明らかとした。PipA, PipB, PipC はそれぞれ異なる基質特異性を持つこと、PipA, PipB は培地中のタンパク質によって転写が誘導されることを報告した(竹内ら, 2013) が、その生理学的役割や転写制御機構は解明されていない。本研究では *A.oryzae* の PIP において、 pip 上流域における転写アクチベーター、あるいはリプレッサーの結合領域をアミラーゼ三重破壊株を用いたレポーターアッセイ法(山崎ら, 2015) で同定することを目的とした。

【方法・結果】

アミラーゼ欠損 *A.oryzae* を宿主に、*pip*A, *pip*B, *pip*C の各上流域とアミラーゼ遺伝子を連結したカセットを挿入し、アミラーゼ発現量を観察するレポーターアッセイを行った。上流域を段階的に欠損させた株間でのアミラーゼ発現量をプレートハロアッセイにより測定し、比較した。その結果、*pip*A の上流−2000 bp から−1000 bp の間を欠損させたプロモーターでは発現量が著しく減少した。一方で、*pip*C のプロモーターは同様の欠損により発現量が著しく増加した。これにより、欠損させた領域に転写因子結合領域が含まれることが示唆された。上流域の長さを変えた株を新たに作製し、推定された結合領域について報告する。

protease, microorganism, transcriptome

講演番号：3C24p05
講演日時：3 月 19 日 15:00～ C 校舎 24 会場

# 染色体重複技術を用いた麹菌二次代謝系制御因子の探索

# The search of novel regulatory factors of secondary metabolism in *Aspergillus oryzae*

○高橋 理、小山 泰二（野田産業科学研究所）
○Tadashi TAKAHASHI, Yasuji KOYAMA (Noda Institute for Scientific Research)

染色体の重複や欠失、転座や逆位等の組換えは、麹菌を含む自然界の様々な生物において起きることが知られている。これらの組換えは、いずれも多くの遺伝子の発現変化を伴うが、このうちの染色体の重複では、gene dosage 効果により、重複領域に位置する多数の遺伝子の発現を一度に上昇させることが期待される。このことから、人為的な染色体重複株における表現型の変化を追うことにより、表現型の変化の原因となる遺伝子をスクリーニングすることが可能である。

これまでに我々は、麹菌を用いて染色体上の任意の領域を重複させる技術を確立した（1,2）。そこで、麹菌の染色体上の様々な領域を重複させた株を作製し、その表現型を調べた。まずフスマ麹を用いた固体培養を行い、マイクロアレイを用いて遺伝子発現の変化を解析したところ、7 番染色体の約 1.2Mb の領域のタンデム重複株において、アスピロクロリン生合成遺伝子クラスターを含む 2 番染色体の末端の領域に位置する遺伝子群の顕著な発現の上昇が観察された。このことから、この重複領域にはアスピロクロリン生合成クラスターの発現制御に関与する因子が存在することが推測された。そこで重複領域に位置する遺伝子で、DNA 結合能を持つと考えられ、なおかつマイクロアレイにおいて遺伝子発現量が増加しているものを抽出し、個々の遺伝子の強制発現株および遺伝子破壊株を作製し、固体培養における遺伝子発現を観察した。その結果、アスピロクロリンを含む複数の遺伝子クラスターの発現制御に関与すると考えられる因子を複数見出した。このうち正の制御に関わると考えられる因子はカビに特異的な転写因子のドメインを持っており、強制発現株においては、複数の遺伝子クラスター内の遺伝子の発現上昇が観察された。一方、負の制御に関わると考えられる因子の遺伝子破壊株においては明確な発現の上昇が観察された。これらのことから、本研究で用いた方法は他の染色体に位置する二次代謝クラスターの制御因子を見つける際に効果的であることが示された。

1) Takahashi et al. Targeted tandem duplication of a large chromosomal segment in *Aspergillus oryzae*. 2014. Appl. Environ. Microbiol. **80**:4547-58
2) 麹菌染色体の大規模多コピー重複株の作製と表現型の解析　農芸化学会 2016 年度大会

*Aspergillus oryzae*, secondary metabolism, gene regulation

発表責任者：高橋　理（ttakahashi@mail.kikkoman.co.jp）

講演番号：3C24p06
講演日時：3 月 19 日 15:25～ C 校舎 24 会場

糸状菌の sirtuin E は対数期から定常期にかけてのグローバルな遺伝子発現の変化を制御する
Fungal sirtuin E, a novel sirtuin isozyme regulates global transcription between exponential growth and stationary phases

○伊藤 英里子、志水 元亨、桝尾 俊介、高谷 直樹（筑波大・生命）
○Eriko ITOH, Motoyuki SHIMIZU, Shunsuke MASUO, Naoki TAKAYA (Tsukuba Univ.)

Sirtuin はヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）クラスⅢに分類される $NAD^+$依存的 HDAC であり、生物界に広く保存されている。sirtuin は多様な遺伝子の発現をエピジェネティックに抑制し、多様な代謝を制御することがわかっているが、糸状菌の sirtuin の機能については、二次代謝系遺伝子の一部を制御することがわかっている以外、不明である。

本研究では、糸状菌 *Aspergillus nidulans* の sirtuin E (SirE) が定常期に発現し、核に局在することを明らかとした。また、*sirE* 遺伝子破壊株 (SirEΔ) では対数増殖期と定常期にヒストン H3 の 56 番目のリジン残基の、定常期にヒストン H3 の 9 および 18 番目のリジン残基のアセチル化レベルが上昇した。さらに、SirEΔではキチナーゼ等の自己溶菌関連酵素の遺伝子発現や活性が低下し、自己溶菌が阻害されるとともに、分生子形成やステリグマトシスチンの生合成といった培養後期に起こる代謝が転写レベルで抑制されることを見出した。

一方、SirEΔでは野生株に比べ、一次代謝系（炭素・窒素代謝および細胞壁の合成）に関与する遺伝子の発現が上昇していた。このうち、α-1,3-glucan synthase *agsB* 遺伝子のプロモーター領域、解糖系遺伝子 *pfkA*, *AN5210*, および *gpdA* のプロモーター領域のヒストンは、SirE によって脱アセチル化され、その遺伝子発現が抑制されていたことから、SirE の直接の制御下にあると考えられた。

さらに、トランスクリプトーム解析によって、SirE が制御する遺伝子群と、対数増殖期と定常期の間で発現が変化する遺伝子群、そして炭素飢餓に応答して発現が変化する遺伝子群の間には有意な相関がみられた。以上の結果から、SirE は定常期に発現し、ヒストンを脱アセチル化することによって、一次代謝から定常期の代謝への移行をグローバルに制御する新たな転写因子であると考えられた。

*Aspergillus*, sirtuin, glucose metabolism

発表責任者：高谷直樹（takaya.naoki.ge@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3C24p07
講演日時：3 月 19 日 15:40～ C 校舎 24 会場

糸状菌 MADS box タンパク質 McmA の多様な機能
Multiple functions of a MADS box protein McmA in filamentous fungi
國武 絵美[2]、李 諾[2]、○玉城 彰悟[1]、金丸 京子[2]、木村 真[2]、小林 哲夫[2] ([1]名大農、[2]名大院・生命農)
Emi KUNITAKE[2], Nuo LI[2], ○Shogo TAMAKI[1], Kyoko KANAMARU[2], Makoto KIMURA[2], Tetsuo KOBAYASHI[2] ([1]Nagoya Univ., [2]Nagoya University Graduate School of Bioagricultural Sciences.)

MADS box タンパク質は真核生物に保存された因子でコンビナトリアル転写因子とも呼ばれ、パートナーとなる複数の転写因子と相互作用して様々な細胞機能を制御する。我々は糸状菌 *Aspergillus nidulans* の MADS box タンパク質 McmA がセルラーゼ遺伝子発現や有性生殖の制御に関わることを明らかにした。本研究では、セロビオース誘導条件での RNA seq 解析において、発現量は低いが *mcmA* 変異により転写レベルが低下したマンナナーゼ遺伝子 *man134A* と *manB*、プロテアーゼ遺伝子 *prtA*、および有性・無性生殖関連遺伝子 *nosA*、*rosA*、*ecdR*、*brlA* に着目し、McmA によりこれら遺伝子の発現誘導が制御される可能性について検証した。
【マンナナーゼ】マンナナーゼ遺伝子群はマンノビオースにより誘導されるため、本二糖による β-マンナナーゼ遺伝子 5 種、β-マンノシダーゼ遺伝子 2 種の誘導に与える *mcmA* 変異の影響を解析した。その結果、*man134A* と *manB* 遺伝子の発現誘導は *mcmA* 変異によりほぼ消失した。マンナナーゼ遺伝子の発現には ClrB の相同因子 ManS が関与する。従って、McmA は ClrB と同様に ManS と相互作用し、*man134A* と *manB* の発現誘導を制御すると考えられる。
【プロテアーゼ】*prtA* は炭素源飢餓により誘導されるため、飢餓およびカゼイン、グルコース、セロビオース存在下での本遺伝子の発現解析を行った。その結果、飢餓条件移行後 4 時間では *mcmA* 変異株で発現低下が見られたが、16 時間後に回復した。一方、カゼイン、グルコース、セロビオースでは 16 時間後においても、*mcmA* 変異株での発現はほとんど認められなかった。以上から、McmA は *prtA* の発現に関与するが飢餓誘導には必須でないと考えられる。
【有性生殖】*mcmA* 変異株は有性生殖の指標となる cleistothecia を形成しない。*nosA* と *rosA* は cleistothecia 形成の制御に関わる転写因子である。有性生殖誘導条件でのこれら遺伝子の発現を解析した結果、野生株では 5 時間で発現のピークが見られたが、*mcmA* 変異株での発現上昇は認められなかった。従って McmA は NsdD などの転写因子と相互作用し *nosA* や *rosA* の発現を制御すると考えられる。
【無性生殖】*ecdR* は分生子形成初期に働く転写因子をコードし、転写因子 *brlA* の上流に存在すると考えられている。*mcmA* 変異株では分生子数の減少が見られたため、これら遺伝子の発現解析を行った。野生株では *ecdR*、*brlA* の順に発現が上昇したが、*mcmA* 変異株では *ecdR* の発現レベルが低下し、*brlA* 発現が著しく遅延した。従って、McmA は EcdR の上流因子と相互作用して無性生殖を制御すると考えられる。

Aspergillus nidulans, MADS box protein, gene regulation

発表責任者：小林 哲夫（koba@nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3C24p08
講演日時：3 月 19 日 15:55～ C 校舎 24 会場

土壌細菌 *Burkholderia multivorans* の土壌における適応機構の解明
Adaptation mechanism of *Burkholderia multivorans* in soil
○田上 諒、西山 依里、大坪 嘉行、永田 裕二、津田 雅孝（東北大院生命）
○Ryo TANOUE, Eri NISHIYAMA, Yoshiyuki OHTSUBO, Yuji NAGATA, Masataka TSUDA (Tohoku Univ.)

環境細菌の研究は主に実験室系で実施され学術的に大きく貢献してきているものの、本来の棲息環境での生きざまは未だ不明である。本研究室では、モデル土壌細菌*Burkholderia multivorans* ATCC 17616株の土壌環境適応戦略を解明する目的で、IVET (*in vivo* expression technology)を用いて土壌特異的に発現する遺伝子を同定してきた(Nishiyama *et al*. Environ. Microbiol. 2010)が、本手法では当該遺伝子の網羅的同定が困難であるとともに、土壌での長期間培養の必要性のために増殖中など短い期間での細菌の挙動を調べることができない。そこで本研究ではより短期間での土壌における細菌の増殖・維持機構を解明するために、土壌から抽出したRNAを用いてRNA-seqによる網羅的な解析とqRT-PCRによる経時的な解析を行い、液体培養系と比較することで、土壌でのATCC 17616株の挙動を解析した。

滅菌土壌へ ATCC 17616 株を $10^6$ CFU/g soil になるように植菌し、経時的に CFU 測定をするとともに RNA を使用した IVET で同定されていた芳香族化合物遺伝子の転写量を qRT-PCR を用いて解析した。一方、土壌での菌密度が最大に達した時点で RNA を抽出し、RNA-seq を実施した。比較としてコハク酸添加最小液体培地とコハク酸添加土壌を用いた。
3 種類の芳香族化合物分解遺伝子の qRT-PCR の結果では、土壌と液体培地において 3 種類とも転写パターンが異なっていた。RNA-seq において土壌で転写された遺伝子のうち炭素源代謝に関わる遺伝子の割合は液体培地と比べて高く、芳香族化合物分解遺伝子や糖・アミノ酸の取り込み・代謝に関する遺伝子が転写され、コハク酸非添加土壌のみで核酸や脂肪酸の分解遺伝子が転写された。これらの結果から、土壌中には増殖可能な程度には炭素源が存在し、増殖後も土壌の炭素源を利用して異化代謝が行われるが、コハク酸非添加土壌では菌数を維持するための十分なエネルギーを確保できず、細胞構成成分を分解してエネルギーを生産しているものと推測された。代謝遺伝子以外には、付着に関与すると推定される遺伝子が複数同定され、その中の一つである Adhesin 合成遺伝子の経時的な転写量を測定したところ、液体培地では定常期に大きく誘導されていたのに対し、土壌では増殖中の菌体での転写も確認された。このことから土壌中で増殖している菌体の生理状態は液体培養系のものと大きく異なる可能性が考えられた。現在、同定した遺伝子の経時的な転写量の解析や破壊株からの表現型解析を行い、個々の遺伝子レベルでの土壌適応における重要性を解析している。

soil, transcriptome, *Burkholderia multivorans*

発表責任者：田上諒（tanoue@ige.tohoku.ac.jp）

講演番号：3C24p09
講演日時：3 月 19 日 16:10～ C 校舎 24 会場

# 土壌細菌 *Burkholderia multivorans* における鉄硫黄クラスター生合成系の転写制御機構の解析

# Analysis of Transcriptional regulation of genes involved in iron-sulfur cluster biosynthesis machinery in *Burkholderia multivorans*

○野々山 翔太、佐藤 拓哉、岸田 康平、大坪 嘉行、永田 裕二、津田 雅孝（東北大院生命科）
○Shouta NONOYAMA, Takuya SATO, Kohei KISHIDA, Yoshiyuki OHTSUBO, Yuji NAGATA, Masataka TSUDA (Tohoku Univ.)

鉄硫黄クラスターは様々なタンパク質のコファクターとして利用され、本クラスターを含んだタンパク質は多種多様な代謝や遺伝子の発現制御等、生命活動の根幹を担っている。主に大腸菌を用いた解析により、鉄硫黄クラスターを合成する機構に複数のタンパク質が関与し、これらをコードする遺伝子はオペロンを形成していることが明らかとなっている。本研究に用いた *Burkholderia multivorans* ATCC 17616 株(以下 ATCC 17616 株)は多種多様な芳香族系化合物分解能を示す土壌細菌であり、推定鉄硫黄クラスター生合成オペロン(*isc* オペロン)を一つ有している。これまでの解析から、ATCC 17616 株の *isc* オペロンの上流には鉄応答転写制御因子である Fur の推定結合配列が存在している。加えて推定 *isc* オペロンの先頭には発現制御を担っている *iscR* と推定される遺伝子が存在し、推定 IscR 結合配列も存在している。このことから、推定 *isc* オペロンの転写調節に Fur と IscR 二つの因子が関与している可能性が示唆された。また、制御因子 *iscR* を破壊した株は *iscR* 下流の *iscS* 以降の遺伝子群の転写量が増加すること、大腸菌の Fur を用いた Fur titration assay によって *isc* オペロンの上流配列と Fur の相互作用が示唆されること等を示してきた。そこで本研究では引き続き鉄硫黄クラスター生合成遺伝子群の発現機構解明を目的とし、IscR に着目した解析を行った。

まず、ATCC 17616 株の *isc* オペロン破壊株の取得を試みた。ATCC 17616 株のアノテーション情報等により、鉄硫黄クラスターの合成に関与する遺伝子群は *isc* オペロンのみであることが予想されたため、アラビノース誘導性プロモーターに ATCC 17616 株の *iscS* 以降の *isc* オペロンを連結したプラスミド pNITara_iscO を相補した状態で遺伝子の破壊を行なった。取得した破壊株をアラビノース非存在下で培養したところ、生育能が著しく低下したことから、ATCC 17616 株にとって *isc* オペロンは生育に必須であり、合成系も *isc* オペロンのみであることが強く示唆された。

次に、大腸菌を用いた系によって発現・精製した IscR と蛍光ラベルした *isc* オペロン上流配列を用いて、ゲルシフトアッセイを行った。その結果、IscR は *isc* オペロン上流配列と相互作用することが明らかとなった。また、相互作用する領域を同定するためにフットプリント解析を行なった結果、オペロンの推定プロモーター領域周辺と相互作用することが明らかとなった。これまでの解析及び以上の結果から、IscR は *isc* オペロンのプロモーター近傍と相互作用し、*isc* オペロンの転写を抑制していることが強く示唆された。現在、これらの結果を総合した制御機構モデルを構築し、さらなる解析を進めている。

iron-sulfur cluster, Ferric uptake regulator (Fur), Transcriptional regulation

講演番号：3C24p10
講演日時：3 月 19 日 16:25～ C 校舎 24 会場

RNA-Seq を用いた冬虫夏草（*Cordyceps militaris*）の感染過程における遺伝子の網羅的解析
Exhaustive analysis on the infection process of the fungus *Cordyceps militaris* by RNA-Seq

○鈴木 智大[1]、道羅 英夫[2]、崔 宰熏[2,3]、鈴木 貴也[4]、加藤 竜也[2,3]、朴 龍洙[2,3,5]、三家本 利之[6]、佐伯 潤[6]、河岸 洋和[2,3,5]（[1]宇都宮大・バイオ、[2]静岡大・グリーン研、[3]静岡大・農、[4]静岡大・理、[5]静大院・創造、[6]にちはら総研）

○Tomohiro SUZUKI[1], Hideo DOHRA[2], Jae-hoon CHOI[2,3], Takaya SUZUKI[4], Tatsuya KATO[2,3], Enoch Y PARK[2,3,5], Toshiyuki MIKAMOTO[6], Jun-David SAEKI[6], Hirokazu KAWAGISHI[2,3,5]
([1]Center for Bioscience Research and Education, Utsunomiya University, [2]Research Institute of Green Science and Technology Shizuoka University, [3]Department of Science, Graduate School of Integrated Science and Technology., [4]Department of Science, Graduate School of Integrated Science and Technology, [5]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, [6]Nichihara Research & Development Laboratories Inc.)

【目的】

冬虫夏草は昆虫などから生じるキノコの総称で、節足動物の病原体として世界的に約 400 種以上が確認されている。冬虫夏草 *Cordyceps militaris*（サナギタケ）は鱗翅目昆虫の蛹の病原体で、北半球の大部分で発生する[1)]。しかし、感染から寄生そして子実体形成における詳細なメカニズムは未だ不明であり、これらを解明することはこの種の菌の生産及び栽培にも有用な情報となることが期待される。

そこで本研究ではサナギタケの感染から子実体形成に至る分子機構の解明を目的として、サナギタケ（NBRC 100741）菌体をカイコ（*Bombyx mori*）の蛹に接種した後の遺伝子発現を次世代シーケンサーを用いて解析した。

【方法及び結果】

1) ポテトデキストロース液体培地で培養した菌糸体、2) カイコ蛹をホモジナイズして作成した培地に分生子を接種した検体および 3)生きたカイコ蛹に分生子を接種した検体（10 日間培養 : 感染初期過程）から RNA を抽出し、次世代シーケンサー（MiSeq）を用いた 75 bp×2 のペアエンドシーケンスを行った。また別途、*C. militaris* NBRC 100741 株から MAT-HMG および MAT-alpha を分離後、各接合型からゲノムを抽出した。その後、次世代シーケンサー（MiSeq）を用いた 300 bp×2 のペアエンドシーケンスを行い、ゲノムの解読も試みた。現在、取得したゲノムデータから各 Mating type のゲノム配列を決定し、RNA-seq のリードをゲノムにマッピングすることで、より正確な遺伝子予測および遺伝子発現差解析を試みている。

1) Sung, GH. et al., Studies in Mycology, 57, 5 (2007).

infection process, fungus, *Cordyceps militaris*

講演番号：3C24p11
講演日時：3 月 19 日 16:50～ C 校舎 24 会場

# 緑膿菌の新規シアン応答転写調節因子の機能解析

# Function of the novel cyanide-responsive regulator in *Pseudomonas aeruginosa*

○多田羅 圭、石井 正治、新井 博之（東大院農生科・応生工）
○Kei Tatara, Masaharu Ishii, Hiroyuki Arai (The University of Tokyo)

【背景・目的】

緑膿菌は、環境遍在性の日和見細菌である。本菌は病原性を持つだけではなく、末端酸化酵素を阻害するシアン化水素を産生する特徴を持っている。末端酸化酵素は好気呼吸の呼吸鎖で酸素に電子を受け渡す酵素であり、好気呼吸におけるエネルギー生産に重要な役割を担っている。本菌は高度に分岐した呼吸鎖を持っており、4 種類の末端酸化酵素(*bo*$_3$、CIO、*aa*$_3$、*cbb*$_3$)を環境に応じて使い分けている。このうち、*cbb*$_3$ 型酸化酵素は 4 タイプ(*cbb*$_3$-1、*cbb*$_3$-2、N3 型アイソフォーム、N4 型アイソフォーム)あり、それぞれ環境に応じて使い分けている。N4 型アイソフォームはシアンに対する耐性が高く、その主要サブユニット遺伝子 *ccoN4* は、新規に見つかったシアン応答転写調節因子 CicR(cyanide-inducible gene cluster regulator)により発現誘導される。またシアンにより転写が誘導される *cicR* 近傍の遺伝子群（PA4129、PA4130、PA4131、*cicR*、*ccoN4*、*ccoQ4*)は緑膿菌のシアン耐性に関与することがわかっている。CicR は GntR スーパーファミリーの MocR サブファミリーに属する転写調節因子である。本研究では、シアン応答転写調節因子 CicR の機能と役割を明らかにすることを目的とした。

【結果・考察】

CicR が調節している形質を明らかにするため、*cicR* 欠損株と *cicR* 相補株の生育試験を行った。その結果、*cicR* 欠損株はシアン添加化学合成培地で生育しなかったが、*cicR* 相補株は生育した。シアン添加化学合成培地にシステインを加えると、*cicR* 欠損株の生育が回復したことから、CicR はシアン存在下でのシステイン生合成を制御していると予想された。CicR はシアン依存的に *ccoN4* の転写を制御している。シアン依存的に転写される PA4130、PA4131、*ccoN4* の上流領域と、*cicR* 欠損株と *cicR* 相補株の Cell-free-extract を用いてゲルシフトアッセイを行ったところ、これらの遺伝子は CicR によって直接的に転写制御されていた。このうち PA4130 は緑膿菌のシステインの生合成に関わる亜硫酸還元酵素(CysI)と相同性が高い。そのため PA4130 が CysI の代替酵素としてシステインを生合成することで、シアン耐性を獲得していると予想される。

*Pseudomonas aeruginosa*, MocR type regulator, cyanide

講演番号：3C24p12
講演日時：3 月 19 日 17:05～ C 校舎 24 会場

好気性光合成細菌 *Roseobacter denitrificans* の光合成色素生産における光受容体タンパク質の役割
Role of photoreceptor in photopigment production in an aerobic phototrophic bacterium *Roseobacter denitrificans*

○山本 麻衣子、石井 正治、新井 博之（東大院農生科・応生工）
○Maiko YAMAMOTO, Masaharu ISHII, Hiroyuki ARAI (Tokyo Univ.)

【目的】好気性光合成細菌である *Roseobacter denitrificans* は嫌気性光合成細菌が嫌気条件でのみ光合成を行うのとは異なり、酸素存在下でも光合成装置の発現がおこり、好気的な条件下でも光合成を行うことができる。この違いの一因は光合成関連遺伝子の発現調節機構の違いによるものだと考えられるが、好気性光合成細菌の光合成関連遺伝子の発現調節機構に関しては不明な点が多い。嫌気性光合成細菌では PpsR がリプレッサーとして機能し、光合成関連遺伝子の発現は酸素と光の存在により抑制される。その抑制はビタミン $B_{12}$ 結合モチーフをもつ PpaA や sensor of Blue Light Using FAD(BLUF)ドメインをもつ AppA といった光受容体タンパク質が PpsR のアンチリプレッサーとして機能し解除される。*R. denitrificans* のゲノム上にも PpsR をコードする遺伝子が存在し、本菌においても嫌気性光合成細菌と同様に PpsR が光合成関連遺伝子のリプレッサーとして機能することが明らかとなっているが、そのアンチリプレッサーは未だに不明であり抑制解除の機構の詳細はわかっていない。そこで本研究では、好気性光合成細菌である *R. denitrificans* の光合成関連遺伝子の発現調節機構を明らかにすることを目的とし、本菌における PpsR のアンチリプレッサーであると予想される PpaA 及び BLUF ドメインをもつ RD-1653 の光合成色素生産における役割について調査した。
【方法】*ppaA* 破壊株と *RD-1653* 破壊株を作製し、暗所、近赤外光、青色光照射下で好気的に培養した。対数増殖期後期の細胞を回収し、そこに含まれる光合成色素の定量を行い野生株と比較した。また、*ppaA* 破壊株は対数増殖期中期の細胞より RNA を抽出し *ppsR* 及びバクテリオクロロフィル(BChl)の生合成に関与する *bchC* の転写量を qRT-PCR により調べた。
【結果】*RD-1653* 破壊株は生育、光合成色素生産のどちらも野生株と違いがなく光合成色素の生合成の調節には関与しないことが示唆された。*ppaA* 破壊株では野生株と比較して暗所、近赤外光条件において細胞に含まれる BChl とカロテノイド(Crt)量の低下が確認された。しかし、*bchC* の転写量は暗所、近赤外光条件において *ppaA* 破壊株の方が野生株より高かった。さらに、*ppsR* の転写量を調べたところ、*ppaA* 破壊株では野生株の 10 分の 1 以下となっていた。これは、*ppsR* が *ppsA* と同じ転写ユニットであり、*ppaA* を破壊したことにより *ppsR* の転写も低下したと考えられる。*ppaA* 破壊株では *bchC* の転写量が高いにもかかわらず BChl と Crt 量が低下することから、PpaA は PpsR のアンチリプレッサー以外の機能をもち光合成色素の生合成を制御していることが示唆された。現在、*ppaA*、*ppsR* 相補株を作製しさらなる解析を進めている。

aerobic phototrophic bacteria, photoreceptor, photopigment production

講演番号：3C24p13
講演日時：3 月 19 日 17:20～ C 校舎 24 会場

*Pseudomonas* 属細菌における Class II LitR を介した光応答メカニズムの解明
Study on the photoresponse mechanism of Class II LitR distributed to *Pseudomonas*
○小林 暢、丸山 貴史、上田 賢志、高野 英晃（日大生資科・生命セ）
○Mitsuru KOBAYASHI, Takafumi MARUYAMA, Kenji UEDA, Hideaki TAKANO (Nihon Univ.)

［目的］LitR は多様な細菌の光応答に関わる光センサー型転写調節蛋白質であり、構造から複数の Class に分類される。Class I LitR は光アンテナ分子にビタミン B12 を利用する。一方、グラム陰性細菌 *Pseudomonas putida* KT 2440 に３つのパラログが存在する Class II LitR はアンテナ分子としてビタミン $B_{12}$ を利用せず、隣接する青色光受容蛋白質 LOV を介して、そのリプレッサー機能が光依存的に制御されることが、我々の遺伝学的解析から予想されている。LOV はフラビンモノヌクレオチドをクロモフォアとする光受容蛋白質の一群であり、本菌の LOV はエフェクタードメインを有さないことから short LOV と呼ばれるが、そのパートナー蛋白質は明らかにされていない。本研究では、*P. putida* 由来の Class II LitR 蛋白質の安定な組換え体の調製が困難であったことから、*Pseudomonas mendocina* の相同蛋白質をモデルに選定し、その青色光受容メカニズムを解明することを目的とした。
［結果･考察］*P. mendocina* は２つの Class II LitR 遺伝子（*pmlR1-2*）と１つの LOV 遺伝子（*pmSB-LOV*）を有する。*P. putida* で見出された *litR* 依存的な遺伝子群の光応答性を確認するため、暗条件および青色光照射条件で培養した *P. mendocina* の菌体から抽出した総 RNA を用いてセミ定量 RT-PCR 実験を行った。その結果、暗条件と比較して青色光照射条件では *pmlR1* や *pmlR2* 近傍の葉酸合成遺伝子（*MDS_3590-3591*）などの転写量増加が認められた。これにより *P. mendocina* も光応答システムを有することが予想された。次に、大腸菌を宿主として PmlR2 と PmSB-LOV の組換え蛋白質を大量発現させ、各種カラムクロマトグラフィーを用いて高純度に精製した。２つの蛋白質間の相互作用解析にはゲル濾過カラムクロマトグラフィーを用いた。PmlR2 と PmSB-LOV をそれぞれ明と暗条件でインキュベートした後、別々にゲル濾過カラムクロマトグラフィーに供したところ、光依存的な分子量の変化は確認されなかった。一方、PmlR2 と PmSB-LOV の混合物に対して同様の解析を行ったところ、青色光照射によって溶出位置が高分子量側にシフトすることが認められた。このことから、PmlR2 は光依存的に PmSB-LOV と相互作用をすることが判明した。以上をもとに、本菌の青色光受容メカニズムを次のように予想している。PmlR2 は暗条件においてリプレッサーとして機能し光誘導性遺伝子の転写を抑制している。青色光を受容することで PmSB-LOV が活性化され、PmlR2 と相互作用を起こすことで PmlR2 は DNA から解離し、転写抑制が解除されるために光誘導性遺伝子の転写が開始される。本研究成果は、short LOV のエフェクター蛋白質として MerR 型レギュレーターが同定された初めての例である。

*Pseudomonas*, LitR, short LOV

講演番号：3C24p14
講演日時：3 月 19 日 17:35～ C 校舎 24 会場

青色光による Class III LitR を介した葉酸合成促進メカニズムの解明
Blue light promotes folate biosythesis via Class III LitR
○角 悟、西山 辰也、高野（白鳥） 初美、上田 賢志、高野 英晃（日大生資科・生命セ）
○Satoru SUMI, Tatsuya NISHIYAMA, Hatsumi TAKANO, Kenji UEDA, Hideaki TAKANO (Nihon Univ.)

[目的] 我々は、グラム陰性細菌 *Burkholderia multivorans* ATCC17616 が有する光誘導性遺伝子群の発現が新たな光センサーClass III LitR によって制御されることを報告してきた。本研究では、光アンテナ分子の同定に至っていない本蛋白質の光感知および転写調節機能を明らかにするとともに、それによって制御される葉酸合成遺伝子 *folE2*（GTP cyclohydrolase I）の役割について検証した。
[方法・結果] LitR 組換え蛋白質を大腸菌を宿主として大量発現させ、高純度に精製した。得られた蛋白質の吸光スペクトルを測定したところ、340 nm 付近に単一の極大吸収が認められた。本ピークは、同蛋白標品に 365 nm の光を 180 秒照射することで完全に消失し、光照射した標品を暗所へ戻すことで徐々に回復した。この現象は、光センサーに特徴的な光サイクルに由来するものと考えられ、本極大吸収がアンテナ分子に由来することを強く支持した。この光照射が LitR の DNA 結合能に及ぼす影響をゲルシフトアッセイにより解析したところ、暗条件の LitR は標的 DNA 配列への特異的な結合を示した一方、光照射された LitR は DNA 結合能が著しく低下していることが判明した。以上より、LitR-光アンテナ分子複合体は、光センサー型 DNA 結合蛋白質として機能することが示された。

*B. multivorans* は 2 つの GTP cyclohydrolase I 遺伝子（*folE1* と *folE2*）を有し、後者は *litR* の近傍に位置している。そこで、光照射が細胞内の葉酸量に及ぼす影響を、葉酸要求性細菌を用いた生物定量法により検証した。その結果、野生株における葉酸量は青色光照射によって 2.6 倍に増大し、*litR* 破壊株においては明・暗両条件下ともに野生株よりも 21 倍高い値を示すことを発見した。一方、*folE2* 破壊株では野生株と対照的に青色光照射下で葉酸量が低下した。次に、本菌の最小培地における増殖速度を調べたところ、野生株では青色光による影響は認められなかった一方、*folE2* 破壊株の増殖速度は青色光照射によって著しく低下した。このことから、FolE2 による葉酸合成は青色光照射下における本菌の生育に重要な役割を担うことが推測された。セミ定量 RT-PCR 法を用いた転写解析では、野生株において *folE1* は構成的な発現を示し、*folE2* は光照射によって強く転写誘導されることが確認された。一方、*litR* 破壊株における *folE2* の転写は光照射の有無に関係なく構成的に高いレベルであった。これらのことから、明条件下で観察された葉酸合成量の増加は、光照射による LitR を介した *folE2* の転写活性化によって引き起こされることが明らかになった。*folE2* の光依存的発現は、*Pseudomonas* 属をはじめとする他のグラム陰性細菌群でも同様に起こると考えられることから、葉酸合成の補強に基づく光耐性メカニズムが広く分布している可能性がある。

Folate, Photosensor, Burkholderia

講演番号：3C24p15
講演日時：3 月 19 日 17:50～ C 校舎 24 会場

# 放線菌 *Streptomyces griseus* における GPCR 様制御系 Cvn1 と転写調節因子 BldD の制御的関係性の解析

# Analysis of regulatory correlation between Cvn1, a G protein-coupled receptor-like regulatory module, and transcriptional regulator BldD in *Streptomyces griseus*

○天野 泰介、上田 賢志、高野 英晃（日大生資科・生命セ）
○Taisuke AMANO, Kenji UEDA, Hideaki TAKANO (Nihon Univ.)

［目的］放線菌ゲノムに特異的に分布する conservon(*cvn*)は、真核生物に分布する G タンパク質共役型受容体に類似した蛋白質複合体をコードしている。これまでの我々の研究によって、*S. griseus* における *cvn1* の破壊は、栄養菌糸に異常な分断を引き起こし、胞子様細胞を形成させることが明らかになっている。この現象は、*cvn1* の破壊が隔壁形成遺伝子群の栄養増殖期における早期発現をもたらすためと考えられている。本研究では、*S. coelicolor* における形態分化開始の中心的なグローバルレギュレーターBldD が、隔壁形成遺伝子群の発現制御に関与するという知見に基づいて、*S. griseus* における Cvn1 と BldD の制御的関係性を明らかにすることを目的とした。
[方法と結果] Cvn1 制御下にある遺伝子の網羅的な同定を目的として、DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、隔壁形成に関与する *ssgB* に加え、胞子形成に関与するシグマ因子 *sigF* や *whiI* などの遺伝子群の転写量が、*cvn1* 破壊によって上昇していることが判明した。そこで、セミ定量 RT-PCR 法によって各増殖期における発現を詳細に観察したところ、*cvn1* 破壊株における上記の隔壁・胞子形成遺伝子群の転写開始時期が約 6～12 時間早まり、栄養増殖期から発現していることがわかった。これらの結果から、Cvn1 は基底菌糸形成期における胞子形成遺伝子の発現を負に制御することで、それらの時期特異的な発現調節を行っていると推測された。ここで同定した Cvn1 制御下の遺伝子群には *S. coelicolor* の BldD レギュロンと共通の遺伝子が多く存在していた。そこで、*S. griseus* の *bldD* 遺伝子を破壊したところ、*cvn1* 破壊株に類似の表現型が認められた。すなわち、固体培地上において気中菌糸形成能を欠損しており、さらに、各培養段階での位相差顕微鏡による観察では、栄養増殖期において隔壁形成による菌糸の分断が観察された。また、*S. coelicolor* において BldD 制御下にあり、隔壁形成に中心的に関わることで知られる *ssgA* の発現レベルを、*S. griseus* においてセミ定量 RT-PCR 法で解析したところ、*cvn1* と *bldD* の両破壊株において早期的な発現が認められた。これらのことから、両破壊株の菌糸の早期的な分断は、*ssgA* の早期発現が要因の一つであることが示唆された。
［考察］上記の結果より、Cvn1 による制御機構と BldD レギュロンの間に有為な相関があることが強く示唆された。そのメカニズムは不明であるが、互いの転写量に直接影響は及ぼさないことを支持する予備知見が得られていることから、転写後段階における連携である可能性が考えられる。

*Streptomyces griseus*, differentiation, transcriptional regulation

講演番号：3C25a01
講演日時：3 月 19 日 09:20～ C 校舎 25 会場

# 抗生物質異種生産のためのリグノセルロース資化性 *Streptomyces* 属放線菌の探索

Screening of lignocellulose-utilizing streptomycetes for heterologous antibiotic production

○春日 和、柴田 彩香、木村 花菜子、牟田口 祐太、志村 洋一郎、小嶋 郁夫 (秋田県大生資)
○Kanou Kasuga, Sayaka Shibata, Kanako Kimura, Yuta Mutaguchi, Yoichiro Shimura, Ikuo Kojima (Akita Pref. Univ.)

【背景と目的】 リグノセルロース(LC)はセルロース系バイオマスの主成分であり、セルロース、ヘミセルロース、リグニンが強固に結合している。近年、LC 系バイオマスを発酵原料としたバイオリファイナリー技術の開発が展開されているが、LC 系原料の前処理や糖化のコストが大きな障害となっている。我々は、LC 系バイオマスの資化能を持つ放線菌による有用物質生産系に着目し、抗生物質の異種生産系の構築を目標として、これまでに土壌よりセルロース高度資化性放線菌 *Streptomyces thermocarboxydus* C42 を分離した。C42 に、放線菌 *Streptomyces kasugaensis* 由来の抗生物質カスガマイシン(KSM)生産遺伝子群の発現プラスミド pKSM109 を導入したところ、アビセル（微結晶性セルロース)、稲わらやスギ辺材等の粉末を主要炭素源として KSM を生産することに成功した。しかしながら、この遺伝子導入株では粉末化した木材の樹種や部材（心材）により菌株の生育および KSM 生産が顕著に低下したため、この影響の少ない LC 資化性放線菌が遺伝子導入系の宿主としては望ましい。そこで本研究では、高い LC 分解活性を示し、遺伝子導入により種々の木材粉末を原料として抗生物質の発酵生産が可能な放線菌株の単離・選抜を行った。

【方法と結果】 秋田県内外で収集した土壌試料から、HV 寒天培地、CS 寒天培地を用いて 1,350 株の放線菌株を単離した。これら菌株を、スギ木材粉末(平均 20 μm 径)を主要炭素源として 0.1%含む W-broth 液体培地で振盪培養し、その培養上清をカルボキシメチルセルロース(CMC)分解アッセイにかけて、CMC 分解円が観察された株をセルラーゼ分泌株として選抜した。このうち特に大きな CMC 分解円が観察された株の培養上清について、ろ紙分解を指標としたセルラーゼ活性(FPase)、カンバ材由来キシランの分解活性を指標としたキシラナーゼ(XYNase)活性を測定し、これら活性値が C42 株のものより顕著に高かった株を LC 高度資化性放線菌株として選抜した。16S rDNA の配列に基づき、これら菌株はすべて *Streptomyces* 属放線菌であることを明らかにした。これら菌株は C42 株と同じ方法により外来遺伝子を導入することが可能であると考え、KSM 生産遺伝子群発現プラスミド pKSM109 を導入し、KSM 生産が可能であるか検討した。これまでに Y810 株と Y1826 株の遺伝子導入株が KSM を生産可能であることを明らかにした。

lignocellulose, *Streptomyces*, antibiotic production

講演番号：3C25a02
講演日時：3 月 19 日 09:35～ C 校舎 25 会場

# アラキドン酸含有脂質を高蓄積する緑藻株の単離

# Isolation of green algal strains that hyperaccumulate arachidonic acid-containing lipids

○加藤 康夫、村井 俊介、野村 泰治（富山県大・生工研セ）
○Yasuo KATO, Shunsuke MURAI, Taiji NOMURA (Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ.)

【目的】高度不飽和脂肪酸(PUFA)の一種で必須脂肪酸であるアラキドン酸(ARA)は、様々な生理活性を有するプロスタグランジン類の生合成前駆体であるばかりでなく、乳児や高齢者の脳や体の発達に不可欠であること、植物油に添加することで「うま味」や「こく味」を増強させること等、その機能性からサプリメント、粉ミルクや調味油への添加物として広く用いられている。現状での ARA 供給法としては *Mortierella* 属糸状菌による ARA 含有脂質の発酵生産が知られているが、ARA の効率的な工業的生産方法が唯一この方法のみであるため、市場での ARA の価格高騰の原因となっている。こうした問題点を解決すべく今回着目したのが、緑藻による ARA 含有脂質の生産である。緑藻は単位面積当たりの脂質生産力が高く、水、$CO_2$、太陽光のみで生育が可能であり、特に光合成により大気中の $CO_2$ を炭素源として利用できることから製造コスト上有利になると思われる。本研究では自然界から幅広く緑藻を単離し、各種栄養条件下にて培養後、脂質構成脂肪酸の解析を行うことで ARA 含有脂質を高蓄積する株を選抜した。
【方法及び結果】富山県内の湖沼水、地面、植物体等よりサンプリングを行い、抗細菌物質としてアンピシリン、セフォタキシム、クロラムフェニコール、ナリジクス酸を混合添加した無機塩および窒素源からなる固体 C 培地上に塗布し、明条件下にて培養することで独立栄養性の緑藻約 1,000 株を単離した。単離株を各々glucose 添加及び無添加の固体 C 培地上に移植し、明・暗の計 4 条件下にて培養した。得られた藻体中への ARA 含有脂質の蓄積を確認するため、HCl / MeOH 処理により脂質構成脂肪酸をメチルエステル(FAME)化し、以後の分析に供した。まず 1 次スクリーニングとして、FAME を二重結合数 0-2 及び 3 以上で分離する簡易 TLC 分析を行い、後者を主に与える緑藻を 263 株選抜した。次に 2 次スクリーニングとして、Ag イオンをコートしたシリカゲル TLC により FAME を二重結合数で詳細に分離分析し、ARA メチルエステルと移動度が一致するものを与える 71 株を選抜した。3 次スクリーニングとして、FAME をキャピラリーガスクロマトグラフィー分析に供し、目的とする ARA 含有脂質蓄積株 20 株を選抜した。このうち、植物体から単離された MS50 株は脂質構成脂肪酸中の 75%以上を ARA が占めるほど高蓄積しており、ARA 含有脂質蓄積株として高いポテンシャルを有していることが分かった。また、MS50 株の脂質から調製した ARA メチルエステルを銀イオンカラムにより単離し、NMR 等の機器分析によりその構造を確認した。現在、MS50 株について単位培養液及び藻体当たりに ARA 含有脂質を最も良く蓄積する培養条件の検討を行っている。

arachidonic acid, green algae, lipids

発表責任者：加藤康夫（ykato@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：3C25a03
講演日時：3 月 19 日 09:50～ C 校舎 25 会場

紅麹発酵産物の神経保護作用の探索
Screening of neuroprotective effect by *Monascus* fermented product
○松本 亜里奈、橘 信二郎、外山 博英（琉球大学農学部）
○Arina MATSUMOTO, Shinjiro TACHIBANA, Hirohide TOYAMA (Ryukyu Univ.)

【背景・目的】現代社会において高齢者の認知症は、介護問題や社会保障費負担の増大、さらには本人や周辺の人々に対する生命の危険につながる重大な課題となっている。認知症の一種であるアルツハイマー病や、パーキンソン病は神経変性を伴い、いずれも高齢者での罹患率が高いことから加齢による発症リスクが考えられている。加齢による活性酸素種の過剰産生が神経細胞の内因性酸化ストレス防御機構に異常をきたし、神経変性を引き起こすとされる。よって、外因性の抗酸化物質の補完は、神経変性疾患の予防に有効な手段となり得る。紅麹菌（*Monascus* 属菌）の発酵産物には様々な抗酸化物質が含まれ、さらに多様な生理活性を有する二次代謝産物が報告されている。しかしながら、これらの抗酸化物質が神経保護作用を有するかどうかは明らかにされていない。そこで、本研究ではラット由来の神経細胞 PC12 株を用いて、紅麹菌発酵産物の神経保護作用をスクリーニングしたので報告する。
【方法】神経細胞の酸化ストレスによる細胞死モデルを構築するため、低酸素症モデルで利用される塩化コバルトを用いた。ポリ- D-リジンコーティングした 96 穴プレートを用い、10%ウマ血清、5%ウシ胎児血清を含む DMEM 培地で 37℃、5% $CO_2$ 条件下で PC12 細胞を培養した。細胞生存率は MTT 法により算出した。細胞死抑制のポジティブ・コントロールとして、1 mM *N*-アセチルシステイン（NAC）を用いた。塩化コバルト誘導細胞死モデルの培養系に対し、紅麹抽出物を添加して細胞死抑制効果（神経保護作用）をスクリーニングした。リアルタイム PCR を用いて、酸化ストレス、細胞死に関係する遺伝子の発現変動を調べた。
【結果】本実験において、300 μM 塩化コバルトを培地に添加したときに有意な細胞生存率の低下（20.4%生存率）を観察した。NAC の添加により、細胞生存率は 65.6%まで回復した。紅麹抽出物（終濃度 1.0 mg/mL）添加により、NAC ポジティブ・コントロールよりも細胞生存率を回復した紅麹菌を 46 株中 11 株選抜することができた。紅麹色素に抗酸化が報告されていることから、紅麹抽出物から色素を除去したところ神経保護作用は保持された。また、抽出物を加熱処理しても保護作用はほぼ維持された。これらの結果より、紅麹抽出物の神経保護作用物質は、非色素、非タンパク質性の水溶性化合物であることが推察された。

*Monascus* fungi, neuroprotective, antioxidant

講演番号：3C25a04
講演日時：3 月 19 日 10:05～ C 校舎 25 会場

発酵法により得たチーズフレーバーの香気特性
Odor properties of the cheese flavor produced with the fermentation method
○西川 卓、青山 武史、服部 祥治、佐野 恵右、高岡 秀明（曽田香料株式会社）
○ Suguru NISHIKAWA, Takeshi AOYAMA, Shouji HATTORI, Keisuke SANO, Hideaki TAKAOKA (SODA AROMATIC Co.,Ltd.)

【目的】
近年、欧米を中心に天然香料に対する需要が高まる傾向に有る。一方、食品業界においては、国産乳原料の供給不安や海外乳原料の価格変動を問題視し、加工食品中の乳原料の削減を検討した結果、低下した乳風味を補う乳代替フレーバーへの訴求が高まりつつある。2－メチルケトンは青カビタイプや白カビタイプのチーズの特徴香気成分で有り、乳製品系のフレーバーとして重要であるが、2－メチルケトンの天然香料は希少であることから、カビの液体培養による発酵法を検討した。得られた香気濃縮物は、当社独自の技術である AROMATCH®を用いて香料機能を評価した。

【方法および結果】
乳糖、ホエイ、酸カゼイン、乳酸、シリコーン樹脂製剤および、天然由来の食品多糖類である増粘安定剤の混合液を加熱殺菌した培地 600ml にブルーチーズ製造用の *Penicillium roqueforti* を接種し、0.5L/min.の通気下、27℃、180rpm で 4 日間培養後、脂肪酸を含む前記混合液 400ml を添加して、0.2L/min.の通気下、27℃、180rpm で 18 時間培養して発酵液を得た。発酵液にエタノールを添加して蒸留により回収したチーズフレーバーを GC 分析した結果、ペクチン並びにある種の加工デンプンを使用した時に 2－メチルケトンの生成量の増加を確認した。チーズフレーバーはポーラスポリマービーズを充填したカラムで濃縮して、得られた香気濃縮物は AROMATCH®を用いて評価した。AROMATCH®とは、GC にて分離された揮発性成分と評価系の揮発成分の混合気体を官能的に評価し、マスキングやエンハンスというような香気同士の相互作用を評価する方法である。今回、評価系に各種乳製品を用いて、チーズフレーバー中の揮発成分のエンハンス効果を確認した。

2-Methylketone, natural flavor of the substitute of the dairy products, AROMATCH

発表責任者：佐野　恵右（Keisuke_Sano@soda.toray.co.jp）

講演番号：3C25a05
講演日時：3 月 19 日 10:20～ C 校舎 25 会場

# 植物生長促進細菌の単離と養液栽培における利用

# Isolation of plant growth-promoting bacteria and their application to hydroponic culture

○小林 誠治[1]、中岡 知規[2]、宮澤 知愛[1]、阿野 貴司[1,2]、岡南 政宏[1,2]（[1]近畿大・生物理工、[2]近畿大院・生物理工）
○Joji KOBAYASHI[1], Tomonori NAKAOKA[2], Chiaki MIYAZAWA[1], Takashi ANO[1,2], Masahiro OKANAMI[1,2] ([1]Fac. Biol. Ortd. Sci. Technol., Kindai Univ., [2]Grad. Sch. Biol. Ortd. Sci. Technol., Kindai Univ.)

【目的】植物生長促進細菌（plant growth-promoting bacteria: PGPB）と呼ばれる土壌細菌は、植物に対して直接的または間接的にその生長を促進する。PGPB は、植物ホルモン様物質の産生、リン、鉄、亜鉛の可溶化などを行うことによって直接的に作用するもの、植物病原菌の増殖を抑制することによって間接的に作用するもの、両方の作用をもつものが知られている。また、一部の PGPB は陸上植物だけでなく、水生植物にも作用を示すことがわかっている。従来の土壌栽培は気候に左右されること、植物病原菌に曝されることなどから安定した生産が難しい。一方、植物工場での養液栽培は気候に左右されることがなく、一般的に植物病原菌に感染しにくいため、安定した生産が可能である。我々は、植物の生長促進、植物病原菌の増殖抑制などといった PGP（plant growth promotion）作用をもつ細菌を単離し、養液栽培で微生物農薬として利用することを目的とした。

【方法および結果】環境中から単離した細菌をウキクサ（*Lemna aoukikusa*）の液体培地に添加し、単離菌の PGP 作用を評価した。その結果、ウキクサの体積を増大、個体数を増加、あるいは、根の伸長を促進させることができる PGPB 候補株を多数得ることができた。これらの PGPB 候補株についてグラム染色を行って形態学的特徴を調べたところ、グラム染色の陽性と陰性、形状の球と桿を問わず、様々な細菌が PGPB 候補株として単離されたことがわかった。また、一部の PGPB 候補株では PGP 作用に加え、植物病原菌の増殖を抑制する抗菌活性も併せ持つこと、および、シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）の芽生えに対しても PGP 作用を示すことがわかった。これらの PGPB 候補株をレタス（ジェンティリナグリーン）の栽培液に添加すると、根や葉の伸長、新鮮重量の増加などといった PGP 作用を示すことが確認できた。

plant growth-promoting bacteria: PGPB, hydroponic culture, lettuce

講演番号：3C25a06
講演日時：3 月 19 日 10:45～ C 校舎 25 会場

# だだちゃ豆の根圏放線菌による植物生長促進活性の評価

# Evaluation for plant growth promoting activities of actinobacteria from Dadacha soybean rhizosphere

○佐々木 伸啓、斎藤 菜摘（鶴岡高専）
○Nobuhiro SASAKI, Natsumi SAITO (National of Institute of Technology, Tsuruoka College)

［背景］

植物の根圏に存在する放線菌の多くは共存関係にある植物に対して生理活性が高いことが知られる。植物生長を促進させる活性として、植物ホルモンの一種のインドール酢酸(IAA)の生産や難溶解性リン酸塩の分解などが知られる(Plant Growth Promoting Activity; PGPA)。この PGPA を有する放線菌を農作物生育の制御をするために利用したいと考えている。山形県鶴岡市の在来作物としてだだちゃ豆があり、この作物は特定の地域の土地でしか栽培できないことが知られる。我々は、だだちゃ豆根圏において土地と作物特有のユニークな細菌が機能している可能性を考えた。本研究では、だだちゃ豆根圏から単離した放線菌株について植物生長促進活性の評価を行った。

[実験方法]

山形県鶴岡市のだだちゃ豆畑から採取しただだちゃ豆の根圏領域から土壌を採取し、HV agar と YS agar を用いて放線菌株を単離した。これらの放線菌株の難溶解性リン酸塩の溶解活性を評価するために $Ca_3(PO_4)_2$ を含む Pikovskaya's agar を用いて培養した。本培地でリン酸塩溶解活性を有する放線菌を培養すると、$Ca_3(PO_4)_2$ の溶解により菌体の周りに透明なハロを観察することができる。14 日後、ハロの直径とコロニーの直径から PSI（Phosphate Solubilization Index）を算出し、活性能力を評価した。高い活性を示した放線菌株の 16S rRNA 遺伝子のシークエンス解析を行った。IAA の生産能力を評価するために、GYM 培地で 96h 培養し、24h ごとにサンプリングを行い、生産した IAA および中間体を Salkowski 試薬で呈色し、吸光光度分析により定量した。

[結果]

根圏領域から 38 株の放線菌株を単離した。$Ca_3(PO_4)_2$ の溶解活性が確認できた菌株は 38 株中 32 株であった。そのうち、PSI が 1.5 以上で活性が高いと評価できた菌株は 7 株であった。16S rRNA 遺伝子のシークエンス解析の結果、この 7 株は全て *Streptomyces* 属であり、*Streptomyces hygroscopicus* や *Streptomyces griseoruber* などと 98 %の相同性を示した。以上の結果より、これらの放線菌はだだちゃ豆のリン吸収を促進させる機能を有すると推測される。次に、異なる PGP 活性として IAA 生産性を調べた。現時点で 38 株中 4 株をテストし、内 2 株の放線菌が IAA の生産活性を有することが示唆された。他の菌株については IAA 活性試験を進めているので、あわせて発表したい。

Actinomycetes, Plant growth promoting activity, Phosphate solubilization

講演番号：3C25a07
講演日時：3 月 19 日 11:00～ C 校舎 25 会場

植物生育促進根圏細菌(PGPR)*Paenibacillus sp.* FPU-37 株は植物の感染特異的タンパク質を誘導する

Plant growth-promoting rhizobacterial strain *Paenibacillus sp.* FPU-37 induces pathogenesis-related proteins in plants.

○石田 瑠美[1]、吉見 僚太[1]、笠原 康一[2]、藤井 豊[3]、奥 直也[4]、木元 久[1]([1]福井県大院・生物資源、[2]福井シード・ベジプロ、[3]福井大・医、[4]富山県大・工)

○Rumi ISHIDA[1], Ryota YOSHIMI[1], Koichi KASAHARA[2], Yutaka FUJII[3], NAOYA OKU[4], Hisashi KIMOTO[1] ([1]Fukui Pref. Univ., [2]Fukuiseed VPC, [3]Fukui Univ., [4]Toyama Pref. Univ.)

【背景・目的】

根圏に生息している微生物の中には植物の生長促進能力を持つものがおり、このような根圏微生物はPGPR（Plant Growth Promoting Rhizobacterium）と呼ばれている。PGPRの効果としては、植物生長ホルモンの分泌、リンや鉄の可溶化、窒素化合物の可溶化および固定などによる植物の成長促進、あるいは抗生物質等を分泌することで植物を病原微生物から防御することなどが知られている。このように植物とPGPRは互いに有益な共生関係を築いていると考えられている。

我々がPGPRとして福井県内の土壌から新規に分離したPaenibacillus属細菌FPU-37株は、植物に対する生長促進効果や強力な抗真菌活性を有している。本研究の目的は、FPU-37株の植物に対する生長促進能力を分子レベルで解明し、植物生長促進剤や土壌改良材、バイオ農薬、種子消毒剤などの農業資材として応用することである。

【方法・結果】

ラボスケールでの植物生育は、植物培養容器（プラントボックス）中にムラシゲ・スクーグ寒天培地を作成し、その上にコマツナおよびトマトの種子を播種し、発芽するまで長日条件（16時間明期、８時間暗期）下で行った。発芽後、FPU-37株を植物の根に感染させ、コントロールとの比較を行った。圃場試験は、大型ハウス内でFPU-37株の培養液を葉面散布および潅水することで行った。病害抵抗性の誘導は、植物の葉組織から全タンパク質を抽出し、植物が病原体に感染した際に植物体内で誘導発現される感染特異的タンパク質群の一種であるグルカナーゼ活性を指標に測定した。種子消毒は、FPU-37株培養液に浸漬したイネの種子をムラシゲ・スクーグ培地上に播種し、雑菌の繁殖を指標に評価した。

病害抵抗性誘導試験の結果、FPU-37 株は実際の圃場試験においてもコマツナ、トマト、コカブ、ブロッコリー、チンゲンサイ、パクチー、ハクサイにおいて病害抵抗性を誘導した。また、イネの種子消毒試験においても、FPU-37 株は発芽率に影響することなく雑菌の繁殖を強く抑制した。現在、エリシターおよび抗菌物質の精製方法を検討中である。

Pgpr, Paenibacillus

発表責任者：石田瑠美（s1573002@g.fpu.ac.jp）

講演番号：3C25a08
講演日時：3 月 19 日 11:15～ C 校舎 25 会場

GAM 培地を用いたヒト腸内細菌最優勢 32 種の培養及び短鎖脂肪酸の生産能とその代謝経路の *in silico* 予測
Use of Gifu Anaerobe Medium as a Standard Medium for Culture of 32 Dominant Species of Human Gut Microbes for *in silico* Pathway Analysis and Quantification of Short-Chain Fatty Acids in the Culture Supernatants

後藤 愛那[2]、奈良 未沙希[1]、杉山 友太[1]、阪中 幹祥[1]、谷内 寛之[1]、北方 彩[1]、奥田 修二郎[3]、片山 高嶺[1,2]、○栗原 新[1] ([1]石川県大生資環、[2]京大生命、[3]新潟大医歯)
Aina GOTOH[2], Misaki NARA[1], Yuta SUGIYAMA[1], Mikiyasu SAKANAKA[1], Hiroyuki YACHI[1], Aya KITAKATA[1], Shujiro OKUDA[3], Takane KATAYAMA[1,2], ○Shin KURIHARA[1] ([1]Ishikawa Prefectural Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Niigata Univ.)

**【背景】**ヒトは腸管内に自らの 10 倍の細胞数、150 菌種以上の細菌からなる腸内細菌叢を保持しており、腸内細菌は炎症性腸疾患や大腸がんなど腸に関連する疾患のみならず、肥満、自閉症など腸とは一見無関係な疾患にも影響を与えていることが報告されている。近年、培養を介さない手法によりヒト腸内細菌最優勢 56 種が報告された（Qin et al., *Nature*, 2010, **464**:59–65）。これらの 56 菌種のうち 44 種についてはその基準株が菌株保存・分譲機関から入手可能である。しかし、菌株保存・分譲機関による推奨培地は菌種間で様々であるためにヒト腸内細菌最優勢種同士の生理学的な比較が困難である。また、推奨培地の多くは作成法が煩雑で、牛ルーメン液などの入手困難な材料を必要とするものも多いため、ポストマイクロビオーム時代に必須な腸内細菌最優勢種の生菌体を用いた研究に対するハードルは依然として高い。この問題を解決するために本研究では、腸内細菌培養培地として知られる Gifu Anaerobe Medium（GAM）を標準培地として用い、ヒト腸内細菌最優勢種の生育の可否を調べた。さらに、ヒト腸内細菌最優勢種の生理機能を比較する際の標準培地としての GAM の実用性を示す目的で、腸内細菌の有用代謝産物として知られる短鎖脂肪酸についての解析を行った。
**【方法・結果】**腸内細菌最優勢 56 種のうち、菌株保存・分譲機関から入手可能な 44 種を推奨培地で培養し、グリセロールストックにて保存した後に GAM 培地での生育の可否を 96 穴ディープウェルプレート上で調べた。生育した菌体について 16S rDNA シーケンスにより培養液中の大部分が目的の菌種であることを示した。試験を行った 44 菌種のうち 32 種が GAM で培養可能であり、これは最優勢 56 種の 57%、入手可能な 44 種の 79%であった。次に、これらの菌種の培養上清由来の短鎖脂肪酸（乳酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸）を定量した。6 菌種が乳酸を、22 菌種が酢酸をそれぞれ 10 mM 以上の濃度で生産した。また、試験した *Bacteroides* 属および *Parabacteroides* 属細菌の全てに相当する 14 菌種がプロピオン酸を、4 菌種（*Roseburia intestinalis*、*Coprococcus comes*、*Anaerotruncus colihominis*、*Eubacterium ventriosum*）が酪酸を生産した。これらの短鎖脂肪酸が検出された菌種について、その代謝経路を *in silico* 予測したところ、既存の研究結果と合致していた。
**【結論】**入手可能なヒト腸内細菌最優勢種の大部分（79%）が GAM で培養可能であった。本研究で開発した 96 穴プレート上の GAM を用いた培養システムは、ヒト腸内細菌最優勢種の増殖の評価や、代謝産物の分析を行う際に再現性の良いプラットフォームとして用いることが可能である。
**【謝辞】**本報告は、公益財団法人発酵研究所（IFO）の寄附講座助成による成果の一部である。

gut microbe, short-chain fatty acids, bacterial culture

発表責任者：栗原新（kuri711@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：3C25a09
講演日時：3 月 19 日 11:30～ C 校舎 25 会場

ヒト腸内細菌最優勢種の菌体内および培養上清における生育段階別のポリアミン解析と新規ポリアミン合成・輸送系存在についての *in silico* 予測
Comprehensive analysis of polyamine of the cell and culture supernatant in dominant human gut bacteria by growth phase: potential presence of novel polyamine metabolism and transport genes of gut microbiota.
○奈良 未沙希[1]、杉山 友太[1]、阪中 幹祥[1]、奥田 修二郎[2]、片山 高嶺[1,3]、栗原 新[1] ([1]石川県大生資環、[2]新潟大医歯、[3]京大生命)
○ Misaki NARA[1], Yuta SUGIYAMA[1], Mikiyasu SAKANAKA[1], Shujiro OKUDA[2], Takane KATAYAMA[1,3], Shin KURIHARA[1] ([1]Ishikawa Prefectural Univ., [2]Niigata Univ., [3]Kyoto Univ.)

【背景】近年、ポリアミン摂取が複数の動物において健康寿命伸長に著効を示すことが報告されている。ヒトはポリアミンを自ら合成するが、細胞内のポリアミン濃度は加齢とともに減少する。このため、ヒトは摂取した食物中に含まれるポリアミンを小腸から積極的に吸収する。一方で小腸の下流にある大腸の内腔にも数 100 μM という多量のポリアミンが存在し、これは腸内細菌叢由来である。ヒト大腸腸管内腔のポリアミン濃度を最適化するためには、ヒト腸内細菌最優勢種のポリアミン合成・輸送系遺伝子を同定し、これらの発現を調節することが重要である。しかし、腸内細菌最優勢種のポリアミン合成・輸送系遺伝子の実験的な同定は進んでいない。そこで本研究では、腸内細菌最優勢種の培養上清と菌体内のポリアミン濃度を測定することで、これらの菌種のポリアミン合成・輸送能を推測した。次に、これら腸内細菌最優勢種における既知ポリアミン合成・輸送系ホモログの有無について *in silico* 解析を行い、新規ポリアミン合成・輸送系の存在の可能性を調べた。
【実験方法】腸内細菌最優勢種のうち GAM 培地で生育可能な 32 菌種について対数増殖期と定常期の培養上清および菌体内における 3 種のポリアミン濃度（プトレッシン、スペルミジン、スペルミン）を測定した。また既知ポリアミン合成・輸送系ホモログの有無を Protein BLAST により検索した。
【結果】プトレッシンについては、14 菌種で培養上清中の濃度が変動し、このうち既知ホモログを有していない 13 菌種が新規輸送系を持つと考えられた。スペルミジンについては、22 菌種で培養上清中の濃度が変動し、このうち既知ホモログを有していない 6 菌種が新規輸送系を持つと考えられた。特に、培養開始から対数増殖期にかけて培養上清中のスペルミジン濃度が減少し、その後、定常期にかけてスペルミジン濃度が増加した 4 菌種については、これまでに細菌で報告のないスペルミジン放出系の存在が示唆された。また、培地からの取り込みと既知合成系ホモログの双方がないにも関わらず、スペルミジンが細胞内から検出された 4 菌種については新規合成系を持つと考えられた。スペルミンについては、31 菌種で培養上清中の濃度が変動し、このうち全ての菌種が既知ホモログを有していないことから、新規輸送系を持つと考えられた。また、培地からの取り込みと既知合成系ホモログの双方がないにも関わらず、スペルミンが細胞内から検出された 11 菌種については新規合成系を持つと考えられた。既知ポリアミン合成・輸送系ホモログを持つ菌種が新規ポリアミン合成・輸送系を持つ場合も考えられることから、腸内細菌最優勢種には多くのポリアミン合成・輸送に関わる未知経路が存在することが明らかとなった。

gut microbiota, polyamine, metabolite

発表責任者：栗原新（kuri711@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：3C25a10
講演日時：3 月 19 日 11:45～ C 校舎 25 会場

# 放線菌に散在する潜在的二次代謝関連遺伝子の融合発現に向けた新培養法の考案と検証

# Development and verification of a novel method for co-exploring the potential of actinomycetes to produce secondary metabolites

○丸山 友子[1]、保坂 毅[2] ([1]信州大院総合理工、[2]信州大バイオメディカル研)
○Tomoko MARUYAMA[1], Takeshi HOSAKA[2] ([1]Grad. Sch. of Sci. and Technol., Shinshu Univ., [2]IBS-ICCER, Shinshu Univ.)

【背景・目的】 約 20 億年前に誕生したとされる放線菌は, 変異や接合, 遺伝子水平伝播, さらにはゲノム DNA 再編を経て, 多種多様な二次代謝産物の生産に関わる遺伝子を獲得してきた. ここ十数年間の全ゲノム解析の結果から, 放線菌には, 通常の培養では未発現または極低発現の二次代謝産物生合成遺伝子が予想以上に多く存在すること, さらには, 二次代謝に関わる遺伝子が複数種の放線菌に散在していることが判ってきた. 我々の研究室では, 放線菌に散在するそのような潜在的な二次代謝関連遺伝子を融合的に発現させるための新たな培養法の開発に取り組んでいる. これまでの検討から, 2 種類の異なる放線菌の胞子を混合して培養するといった極めて簡便な手法（以下, 胞子混合接種培養法と示す）で, 親株では見られない新しい性質が付与された放線菌株を取得できることを明らかにした. 本発表では, その成果を中心に報告する.

【方法】 本研究では, 4 菌株の放線菌［*Streptomyces lividans* 1326 および 3 菌株の土壌分離放線菌（*Streptomyces* sp. SUIC-11, *Streptomyces* sp. SUIC-12, *Nocardia* sp. SUIC-13)］を使用した. それらのうち 2 菌株の胞子（各菌株約 100 個ずつ）を 1 ml の滅菌水中で混合した後, 全量を GYM 寒天培地に移し, 30℃で 8 日間培養した. 出現したコロニーを GYM および MR5 寒天培地でさらに培養し, 各コロニーの性質（胞子形成や色素生産性, 抗菌物質生産性など）を両親株のものと比較した. 加えて, 寒天培養で親株と異なる性質が認められた菌株については, 液体培養後, 代謝プロファイルの HPLC 分析や細胞内全タンパク質の発現プロファイル解析に供した.

【結果･考察】 上述した方法で, *S. lividans* 1326 と土壌分離放線菌 SUIC-11, SUIC-12, あるいは SUIC-13 を組み合わせたところ, 親株と明らかに異なる性質を示した菌株を計 32 菌株取得できた［それぞれ, 6 菌株（1326・SUIC-11）, 6 菌株（1326・SUIC-12）, 20 菌株（1326・SUIC-13)］. 興味深いことに, それらのうち際立って親株と異なる性質が認められた MSICA-1 株（*S. lividans* 1326 と *Streptomyces* sp. SUIC-11 の組み合せで出現）は, 液体培養において, 両親株では生産が認められない二次代謝産物（成分 A）を高生産することが明らかとなった. 加えて MSICA-1 株は, *S. lividans* 1326 とほぼ同様のタンパク質発現プロファイルを示すものの, *Streptomyces* sp. SUIC-11 で認められるタンパク質をも発現することが判明した. 以上の結果から, 胞子混合接種培養法で, 親株の能力が融合された新しい性質を持つ放線菌を創製できる見通しを得た. 現在, MSICA-1 株の全ゲノム解析とともに, 同菌株が生産する成分 A の単離精製・構造解析に取り組んでいる.

actinomycetes, secondary metabolism, cryptic gene clusters

発表責任者：保坂 毅（thosaka@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3C25p01
講演日時：3 月 19 日 14:00～ C 校舎 25 会場

# 大腸菌によるアミノプロピルカダベリンの生産

# Production of aminopropylcadaverine by *Escherichia coli*

○松岡 利奈[1]、中村 篤央[2]、松本 光晴[2]、鈴木 秀之[1]([1]京都工繊大・応生、[2]協同乳業研究所)
○Rina MATSUOKA[1], Atsuo NAKAMURA[2], Mitsuharu MATSUMOTO[2], Hideyuki SUZUKI[1]
([1]Kyoto Inst. of Technology Coll., [2]Kyodo Milk Industry CO.,LTD.)

【目的】アミノプロピルカダベリン（APCad, $NH_2$-$(CH_2)_5$-NH-$(CH_2)_3$-$NH_2$）は、特定の条件下で生体内に微量に合成されるポリアミンである。その構造は、生体内の主要なポリアミンの一つであるスペルミジン（$NH_2$-$(CH_2)_4$-NH-$(CH_2)_3$-$NH_2$）とよく似ている。スペルミジンはタンパク質合成促進や細胞増殖の促進等に関与するが、APCad もまたスペルミジンと同様の働きをすることが示唆されている。しかし、APCad は市販されていないため、その研究にはまず APCad を調製する必要がある。本研究では、大腸菌にリジンから Cad を経由して APCad を大量生産させることを目指した。
【方法】大腸菌において、APCad は次の 2 つの段階を経てリジンから生合成される。①リジン脱炭酸酵素（CadA, LdcC）の働きによって、リジンがカダベリンに変換される。②*S*-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素（SpeD）によって脱炭酸化された *S*-アデノシルメチオニンのアミノプロピル基をスペルミジン合成酵素（SpeE）がカダベリンに転移することで APCad が合成される。しかし、SpeE の本来の基質はプトレッシンである。そこで、プトレッシン生合成経路欠損株（Δ*speA* Δ*speB* Δ*speC* Δ*speF*）を作製した。この菌株を宿主として、APCad 合成に関与する遺伝子を高発現するプラスミド（pQE-80L-T5p-*cadA*$^+$-*ldcC*$^+$-*yacC*$^+$-*speE*$^+$-*speD*$^+$）を導入した菌株を作製した。
一方、大腸菌においては、スペルミジンアセチルトランスフェラーゼ（SpeG）によるアセチル化、およびグルタチオニルスペルミジンアミダーゼ/シンターゼ（Gss）によるグルタチオニル化により、APCad が代謝されると予想された。そこで、*speG* および *gss* 遺伝子を欠損した菌株を作製した。作製した菌株をリジン添加培地で培養し、菌体内および培養上清中のポリアミン濃度を HPLC により分析した。また、APCad は GC-MS により同定した[1)]。
【結果】プトレッシン生合成経路欠損株において、APCad が生合成されることを確認した。また、pQE-80L-T5p-*cadA*$^+$-*ldcC*$^+$-*yacC*$^+$-*speE*$^+$-*speD*$^+$導入株では、APCad 蓄積量が増加した。
Δ*speG* 株では APCad 蓄積量の増加が見られたが、Δ*gss* 株では APCad 蓄積量に変化が見られなかったことから、APCad は SpeG によるアセチル化を経て代謝されると考えられた。アセチル APCad は菌体内外で観察されたが、APCad は菌体外には見られなかったことから、APCad は SpeG によるアセチル化を受けた後に、アセチル APCad の形で放出され、菌体内の APCad 濃度が調節されていると考えられた。

Ref. 1) 中村篤央、GC-MS を用いたポリアミン分析. ポリアミン **2**(2), 54-58 (2015).

*Escherichia coli*, polyamine, aminopropylcadaverine

発表責任者：鈴木秀之（hideyuki@kit.ac.jp）

講演番号：3C25p02
講演日時：3 月 19 日 14:15～ C 校舎 25 会場

# 大腸菌によるトリテルペンの生産
# Bioproduction of triterpenes by genetic-engineered *E. coli*

○竹村 美保、三沢 典彦（石川県大）
○Miho TAKEMURA, Norihiko MISAWA (Ishikawa Pref. Univ.)

ステロール、ジンセノサイド、グリチルリチンなどのトリテルペンは、重要な薬理作用を持っている。これらトリテルペンは、squalene を共通の前駆体とし、2,3-oxidosqualene を経て、種々の環化酵素によって合成される。これまでに、大腸菌でのトリテルペン合成が試みられていたが、squalene から 2,3-oxidosqualene を合成する酵素 Squalene epoxidase (SQE)が大腸菌では機能しないために、トリテルペンの生産はできないと報告されていた

本研究では、大腸菌でトリテルペンを生産させるために、Squalene epoxidase の活性に重要な補因子である、電子伝達系タンパク質ならびに NADPH 再生酵素を大腸菌に共導入し、その効果を調べた。方法としては、2,3- oxidosqualene 生産用ベクターpAC-Hpidi/AtSQS/AtSQE、環化酵素遺伝子発現ベクターpETD-EtAS （β-amyrin 合成用）あるいは pETD-AtCAS1（cycloartenol 合成用）に加えて、電子伝達系タンパク質および NADPH 再生酵素遺伝子発現ベクターを大腸菌に共導入した。電子伝達系としては、*P. putida* camAB, *Nostoc* RED/FER, *S. oleracea* FNR/FER, *A. thaliana* ATR2 の 4 種類を用いた。NADPH 再生系酵素としては、*E. coli* zwf, *B. subtilis* gdh の 2 種類を用いた。これらの遺伝子を組み合わせて導入した大腸菌を培養し、トリテルペンを抽出、GC-MS により分析した。

その結果、これら補因子を導入しなくても、その上流の酵素 Isopentenyl diphosphate isomerase (idi)を導入することにより、トリテルペンであるβ-amyrin あるいは cycloartenol が先産されることが明らかになった。このことは、大腸菌においても SQE は機能するが、活性が非常に低いために、これまで大腸菌では活性が検出できなかったことを示唆している。本研究においては、*idi* 遺伝子を導入することで基質が増加し、結果として、産物であるトリテルペンが検出レベルまでに達したと考えられる。

さらに、補因子の導入によってこれらトリテルペンの生産が上昇することがわかった。ただし、電子伝達系あるいは NADPH 再生系酵素遺伝子単独ではあまり効果がなく、両者を組み合わせることによって、何も補因子を入れない場合に比べて、2-3 倍にトリテルペンの生産量が増加した。これらのことから、大腸菌においてトリテルペンを効率的に生産させるためには、補因子の導入が効果的であることが明らかとなった。

triterpene, bioproduction, E. coli

発表責任者：竹村美保（mtake@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：3C25p03
講演日時：3 月 19 日 14:30～ C 校舎 25 会場

アシル基転移酵素遺伝子の破壊によるモノアシル型マンノシルエリスリトールリピッドの生産株の創出

Characterization of acyltransferase gene deletion mutant of *Pseudozyma tsukubaensis*

○雑賀 あずさ[1]、小池 英明[2]、福岡 徳馬[1]、山本 周平[3]、岸本 高英[3]、森田 友岳[1]（[1]産総研・機能化学、[2]産総研・生物プロセス、[3]東洋紡（株）・敦賀バイオ研）

○Azusa SAIKA[1], Hideaki KOIKE[2], Tokuma FUKUOKA[1], Shuhei YAMAMOTO[3], Takahide KISHIMOTO[3], Tomotake MORITA[1] ([1]ISC, AIST, [2]BRI, AIST, [3]Tsuruga Inst. Technol., TOYOBO CO., LTD.)

マンノシルエリスリトールリピッド（MEL）は、*Pseudozyma* 属酵母がバイオマスから生産する機能性糖脂質であり、優れた界面活性、自己組織化、抗菌活性、毛髪修復や皮膚の保湿効果など、多彩で実用性の高い物性・機能を有している。MEL は、マンノースとエリスリトールで構成される糖骨格にアシル基が結合しており、アシル基の位置や数の異なる同族体が複数存在する。*Pseudozyma* 属酵母は、主に、ジアシル型 MEL（脂肪酸鎖が 2 本結合）を生産するが、培養条件によっては、反応中間体であるモノアシル型 MEL（脂肪酸鎖が 1 本結合）も生産する。モノアシル型 MEL は、ジアシル型 MEL と比べて親水性が高いことから、ジアシル型とは異なる用途展開が期待されている。しかしながら、培養技術の改良によるモノアシル型 MEL の選択的生産は困難であり、生産技術の開発が大きな課題となっている。そこで本研究では、糖骨格に脂肪酸鎖を結合するアシル基転移酵素に着目して、MEL 生産酵母の遺伝子破壊による、モノアシル型 MEL 生産株の創出を目指した。

MEL は、糖転移酵素（PtEMT1p）、アシル基転移酵素（PtMAC1p, PtMAC2p）、アセチル基転移酵素（PtMAT1p）の反応によって生合成されており、本研究では、PtMAC2p をコードする遺伝子（*PtMAC2*）の破壊を試みた。まず、MEL-B 生産酵母である *P. tsukubaensis* 1E5 株を紫外線照射した後、5-フルオロオロチン酸（5-FOA）含有寒天培地でスクリーニングして、ウラシル要求性と 5-FOA 耐性を併せ持つ変異株（URA5$^-$株）を取得した。シーケンス解析の結果、URA5$^-$株では *PtURA5* 遺伝子内部のフレームシフト変異が確認できた。*PtMAC2* 破壊用の遺伝子断片（*PtMAC2* 上流領域-*PtURA5*-*PtMAC2* 下流領域）を作成して、URA5$^-$株に導入し、ウラシル要求性をマーカーに、*PtMAC2* 破壊株を取得した。*PtMAC2* が *PtURA5* で置換されていることは、ゲノムをテンプレートとした PCR で確認した。*PtMAC2* 破壊株を、オリーブ油を炭素源として培養し、培養液の酢酸エチル抽出物を薄層クロマトグラフィー（TLC）で分析したところ、親株が生産する MEL-B とは移動度の異なる単一のスポットが確認できた。核磁気共鳴分光法（NMR）による構造解析の結果、*PtMAC2* 破壊株が生産した単一の糖脂質はモノアシル型 MEL であることが明らかとなった。以上の結果から、アシル基転移酵素の遺伝子を破壊することで、モノアシル型 MEL を選択的に生産する遺伝子組換え株の創出に初めて成功した。本研究は、JST の研究成果展開事業 A-STEP により実施した。

mannosylerythritol lipid, basidiomycetous yeast genus *Pseudozyma*, homologous recombination

発表責任者：森田友岳（morita-tomotake@aist.go.jp）

講演番号：3C25p04
講演日時：3 月 19 日 14:45～ C 校舎 25 会場

パスウェイエンジニアリングを施した大腸菌によるセスキテルペン生合成の最適条件検討
Optimized condition for efficient production of sesquiterpenes in Escherichia coli with pathway engineering

○須藤 尚史[1]、八反 順一郎[1]、竹村 美保[1]、原田 尚志[2]、新藤 一敏[3]、三沢 典彦[1]([1]石川県大・生資研、[2]鳥大院生応工、[3]日女大・家政)
○Naofumi SUDO[1], Junichiro HATTAN[1], Miho TAKEMURA[1], Takashi HARADA[2], Kazutoshi SHINDO[3], Norihiko MISAWA[1] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]Tottori Univ., [3]Japan Women's Univ.)

【目的】パスウェイエンジニアリングを施した大腸菌により、セスキテルペンを効率良く生合成するために、培養条件を最適化する。
【方法】メバロン酸経路等の一連の酵素遺伝子群を導入した大腸菌に、基質としてメバロノラクトンまたはリチウムアセト酢酸を加えることで、セスキテルペンの前駆物質となるファルネシル二リン酸（FPP）を多量に生合成することができる 1)。芳香植物由来のセスキテルペン合成酵素遺伝子を、上記組換え大腸菌に導入して発現させ、効率良くセスキテルペンを生合成するため、IPTG 添加の時期と濃度、大腸菌株の選択、抽出方法など、最適な生産条件を検討した。
【結果】これまでに、ショウガ科植物の金時ショウガおよびツバキ科植物のカンツバキから、それぞれ、γ-アモルフェンおよびバレリアノール合成酵素遺伝子を単離した。今回我々は、これらのセスキテルペンの効率生産に向けて、大腸菌の培養条件を検討した。γ-アモルフェンの生産は、IPTG 濃度を、これまでの 0.025 mM から 0.1 mM に変えることで約 2.2 倍、添加の時期を培養開始直後から 24 時間後に変更することで約 1.5 倍増加した。大腸菌株として、BL21(DE3)、W3110(DE3)、JM101(DE3)を用いたが、BL21(DE3)を用いた場合がどちらのセスキテルペンの生産でも高効率であった。抽出方法としては、菌体ペレットから酢酸エチルで抽出する方法と、培養液にデカンを重層する方法を比較した。1 L 当りの生産量はバレリアノールの場合はデカンの方（9.8 mg/L）が酢酸エチル（5.9 mg/L）より約 1.7 倍抽出効率が良く、γ-アモルフェンの場合はデカン（3.6 mg/L）と酢酸エチル（4.0 mg/L）とでピーク時の抽出効率はほぼ同じであった。

1) H. Harada et al., Appl. Microbiol. Biotechnol 81:915-925 (2009).

Sesquiterpene, Escherichia coli, Optimized culture condition

発表責任者：三沢 典彦（n-misawa@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：3C25p05
講演日時：3 月 19 日 15:00～ C 校舎 25 会場

# Development of terpenoid production platform using Streptomyces reveromyceticus

○Ammara KHALID[1,2], Hiroshi Takagi[1], Suresh Panthee[1], Hiroyuki Osada[1,2], Shunji Takahashi[1]
([1]RIKEN, CSRS. Chemical Biology group., [2]Saitama University)

**[Objective]** Terpenoids comprise the largest class of natural products, some of which are utilized for pharmaceuticals, fragrances, and fuels. Generally, the mass production of valuable terpenoid compounds was hampered by low abundance in producing organism and the difficulty in chemical synthesis. Therefore, the development of microbial biosynthetic platform has been a key approach. So far, extended efforts have been made to establish microbial terpenoid production platform using *Escherichia coli* and yeast. On the other hand, a specialized platform for terpenoid production has not been developed for *Streptomyces* spp., although they have a large capacity to produce secondary metabolites such as polyketide compounds. *Streptomyces reveromyceticus* has an ability to produce more than 1 g/L reveromycins (RMs) and 0.7 g/L furaquinocins (FQs), suggesting the sufficient supply of biosynthetic precursors such as acetyl-CoA and malonyl-CoA. The objective of this study is to develop *S. reveromyceticus* platform specialized for terpenoid production.
**[Results and Discussion]** We examined optimum promoters which can efficiently activate mevalonate gene cluster which is included in FQ gene cluster. Then, we performed coordinate expression of genes of interest using transcriptional regulator (Fur22) and its target promoter set. When introducing farnesyl pyrophosphate synthase gene from chicken, botryococcene synthase genes from alga, or drim-8-ene-11-ol synthase gene from *Aspergillus oryzae*, *S. reveromyceticus* was able to produce significant amount of botryococcene and drim-8-ene-11-ol. Here we showed that *S. reveromyceticus* was the attractive biosynthetic platform to produce terpenoid compounds derived from a variety of organism.

Streptomyces, Terpenoids, host platform

発表責任者：Ammara Khalid（ammara.khalid@riken.jp）

講演番号：3C25p06
講演日時：3 月 19 日 15:25～ C 校舎 25 会場

*Rhodosporidium paludigenum* BS15 株よる菌体外脂質生産
Extracellular lipid production by *Rhodosporidium paludigenum* BS15
○真野 潤一[1]、小野 裕嗣[2]、池 正和[1]、徳安 健[1]、橘田 和美[1]、北岡 本光[1] ([1]農研機構食品研、[2]農研機構高度解析センター)
○ Junichi MANO[1], Hiroshi ONO[2], Masakazu IKE[1], Ken TOKUYASU[1], Kazumi KITTA[1], Motomitsu KITAOKA[1] ([1]Food Research Institute, NARO, [2]Advanced Analysis Center, NARO)

【目的】カロテノイド、高度不飽和脂肪酸、バイオサーファクタントなど、様々な脂質が発酵法により生産され、その一部は食品として利用されている。従来より生産性の高い菌株を開発することで、これら食品素材の低価格化が期待できる。また、多くの油脂を輸入に頼る我が国において、国内の余剰資源から食品、化成品、燃料に利用可能な油脂を生産することは、食料やエネルギーの国内自給率向上にもつながる。こうした理由から、本研究グループでは油脂生産に適した微生物菌株の開発に取り組んでいる。これまでに、土壌から菌体外に脂質を生産する赤色酵母 BS15 株を分離している。今回は、当該菌株の諸性質の解明、ならびに、生産される菌体外脂質の化学構造の解析を行ったので報告する。

【方法及び結果】茨城県内の土壌から、粘性の高い脂質を菌体外に著量生産する赤色酵母 BS15 株を分離した。本菌株の 26S rRNA 遺伝子の塩基配列を解析したところ、NCBI のデータベースに登録されている *Rhodosporidium paludigenum* の塩基配列と完全に一致した。このことから、BS15 株を *Rhodosporidium paludigenum* と同定した。次に、当該菌株の生育特性について評価を行い、生育に最適な pH が５、培養温度が 30℃であることを明らかにした。続いて、バッフル付きフラスコを用いてフェドバッチ培養を行い、菌体外脂質の生産性を評価した。その結果、12 日間の培養で培養液１mL あたり 103 mg の菌体と 110 mg の菌体外脂質が得られた。この脂質を薄層クロマトグラフィー、MS および NMR を用いて解析したところ、3－ヒドロキシパルミチン酸とマンニトールおよびアラビニトールを主要な構成成分とするポリオールエステルであることが明らかとなった。このポリオールエステルは油脂の乳化作用をもつことから、バイオサーファクタントとしての産業利用も期待できる。

Rhodosporidium paludigenum, lipid, polyol ester

発表責任者：真野潤一（jmano@affrc.go.jp）

講演番号：3C25p07
講演日時：3 月 19 日 15:40～ C 校舎 25 会場

# 低温増殖性乳酸菌 *Lactobacillus sakei* UONUMA-3 株のカロテノイド産生と環境ストレスの影響

# Effect of stress condition on the production of carotenoid in psychrotrophic lactic acid bacteria *Lactobacillus sakei* UONUMA-3

○西脇 俊和、小林 和也、渡辺 聡（新潟農総研食研セ）
○Toshikazu Nishiwaki, Kazuya Kobayashi, Satoshi Watanabe (Niigata Agric. Res. Inst.)

【目的】

雪室保存の野沢菜漬けから分離した低温増殖性乳酸菌 *Lactobacillus sakei* UONUMA-3 株は、固体培地上では黄色のコロニーを形成し、振とう培養により菌体の色調は著しく濃化する。乳酸菌の一部ではカロテノイドを産生することが知られており、UONUMA-3 株は酸化ストレス応答によってカロテノイドを産生すると推測された。そこで本研究では、UONUMA-3 株の食品加工やプロバイオティクスへの利用を目的に、カロテノイド産生と環境ストレスの影響を検討する。

【方法及び結果】

UONUMA-3 株が産生する色素は、好気培養（250ml 容フラスコに MRS 培地 50ml を添加して 150rpm で振とう培養）した後、菌体からメタノールを用いて抽出した。抽出した色素を HPLC/PDA 及び LC/APCI-MS により分析した結果、400～470nm に３つの極大吸収をもつピークが複数検出され、いずれも $m/z$ = 403.7 であった。また、既知のカロテノイド産生性乳酸菌がもつカロテノイド合成酵素のうち、ジアポフィトエン不飽和酵素（デヒドロスクアレン不飽和酵素、crtN）をコードする遺伝子の配列をもとに縮重プライマーを作成し、UONUMA-3 株の当該 DNA の増幅を試みたところ、予測される鎖長の遺伝子断片が検出された。これらの結果から UONUMA-3 株が産生する黄色色素は、C30 カロテノイドである 4,4’-ジアポニューロスポレン（分子量; 402.67）及びその異性体であると推定された。

UONUMA-3 株のカロテノイド産生量は、好気培養することにより嫌気培養した場合と比較して大きく増加した。また、嫌気培養時では、培地 pH の低下に伴い産生量が増加する傾向が見られた。現在、カロテノイド産生促進条件及び胆汁酸等の生育に及ぼす影響を詳細に検討している。

*Lactobacillus sakei*, carotenoid, stress condition

発表責任者：西脇俊和（nisiwaki@ari.pref.niigata.jp）

講演番号：3C25p08
講演日時：3 月 19 日 15:55～ C 校舎 25 会場

# オルニチン由来アルカロイドの微生物生産系の構築にむけて

# Studies toward the microbial production of ornithine-derived alkaloids

○長谷部 文人、大石 和敬、谷 美生夏、相沢 光輝、川嶋 智佳、鮒 信学（静岡県大・食栄）
○Fumihito HASEBE, Kazuhiro OISHI, Mioka TANI, Teruki AIZAWA, Tomoka KAWASHIMA, Nobutaka FUNA (University of Shizuoka)

【目的】

アルカロイドは含窒素有機化合物であり、植物や動物、微生物などが生産し、その構造は多様である。そのうち植物由来のアルカロイドは強い生理活性を示し、医薬・創薬などを通じて人類に多大な恩恵を与えている。しかしながら、それらは植物に特異な代謝産物であり、微生物による安価大量生産が実現されていない。植物代謝産物の微生物生産は重要であり近年世界で研究が行われている。例えば、抗マラリア剤 Artemisinin の前駆体の酵母生産 [1]、疼痛緩和剤 Morphine の前駆体 [2] の酵母生産などである。ナス科やコカノキ科の植物が生産するアルカロイドであるニコチンやコカインなどはその構造中に *N*-メチルピリジン環骨格を含み、オルニチンを生合成前駆体とすることが知られている。その生合成においてオルニチンは、まず ornithine decarboxylase（ODC）によりプトレシンへと変換される。次いで putrescine *N*-methyltransferase（PMT）、*N*-methylputrescine oxidase（MPO）によって *N*-methyl aminobutanal（*N*-mab）が生成し、平衡の関係にある *N*-methyl-$\Delta^1$-pyrrolinium cation（*N*-mpyr）が自然環化によって生じる。その *N*-mPyr を共通の中間体として C3 や C5-N ユニットの縮合等以降の反応が分岐することにより多様なオルニチン由来アルカロイドが生合成されると考えられている。

本研究ではオルニチン由来アルカロイドの生産を目指すために、まず植物由来の PMT や MPO を大腸菌内で共発現させることで *N*-mab または *N*-mPyr 生産を試みた。

【方法・結果】

PMT と MPO はナス科の植物である *Nicotiana tabacum* において既に同定されている。そこで、それらの cDNA について大腸菌用にコドン最適化を行った合成 DNA を作製し、それぞれ pET28a と pCold-TF に挿入したプラスミドを作製した。作製したプラスミドを *Escherichia coli* BL21(DE3)に導入した株を作製し、組換え酵素を Ni-NTA カラムを用いて精製した。その結果、PMT および MPO を可溶性で取得することが出来た。組換え PMT および MPO を含む大腸菌破砕液をプトレシンと *S*-adenosylmethionine と共にインキュベートし、反応サンプルをダンシル化したものを LC-MS で分析した。その結果、*N*-mab のダンシル化体に相当するイオンのピークが確認された。本大会では共発現株での *N*-mab または *N*-mpyr の異種生産の検討結果についても発表する予定である。

[1]Paddon, C.J. *et al*. *Nature* **496**, 528-32 (2013). [2]Galanie, S., *et al*. *Science* **349**, 1095-100 (2015).

microbial production, ornithine, alkaloids

講演番号：3C25p09
講演日時：3 月 19 日 16:10～ C 校舎 25 会場

腸内マイクロバイオーム内の異菌種間の独立代謝系を介したプトレッシン産生経路
Putrescine production pathway via independent metabolic systems between bacterial species in intestinal microbiome.
○北田 雄祐[1]、東樹 宏和[2]、栗原 新[3]、松本 光晴[1]([1]協同乳業・技術開発、[2]京大人環、[3]石川県大・生資環)
○ Yusuke Kitada[1], Hirokazu Toju[2], Shin Kurihara[3], Mitsuharu Matsumoto[1] ([1]Research Laboratories, Kyodo Milk Industry Co., Ltd., [2]Kyoto Univ., [3]Ishikawa Pref. Univ.)

**【背景・目的】**腸内では 100～200 種類／個体の腸内常在菌が環境に適応し相互に影響しつつ共存し、同時に様々な代謝産物を産生して宿主に影響を与えている。腸内細菌の代謝産物の 1 つであるポリアミン（PA）はオートファジーの誘導及び腸管バリア機能の増強を行う生理活性アミンである。我々はこれまでに腸内 PA 濃度の適正化による寿命伸長効果（マウス）等を明らかにしてきた。また、腸内細菌の PA 産生機構として、単独菌種の PA 産生系ではなく、中間物質を介した複数菌種による新規 PA 産生系を見出した。具体的には、Arginine decarboxylase (AdiA)と Arginine-agmatine antiporter (AdiC)で構成される耐酸性機構を持つ *Escherichia coli* と、Agmatine deiminase (AguA)と Agmatine-putrescine antiporter (AguD)で構成されるエネルギー産生機構を持つ *Enterococcus faecalis* が組み合わさることでアルギニンからプトレッシン（PA の一種、Put）が産生される経路である。本研究では、上記の Put 産生系がこれら 2 菌種に限定されるものではなく、同様の遺伝子を保有する細菌群に共通する Put 産生機構である可能性を、他の腸内常在菌をターゲットに検討した。
**【方法】***E. coli* の AdiA、AdiC と相同性が高い遺伝子を持つヒト腸内常在菌を Yatsunenko ら(1)の 528 試料由来の常在菌データ(16S の OTU)に含まれる菌種から検索した。AdiA、AdiC ホモログを有する *Citrobacter youngae* と *Fusobacterium varium* をアルギニン含有液体培地にて、単独或いは *En. faecalis* との混合培養を行い、培養液の Put 濃度を測定した。次に *F. varium* 或いは *En. faecalis* 単独定着ノトバイオートマウスとこれらの混合定着ノトバイオートマウスを作製し、糞便中の Put 濃度を測定した。また、Yatsunenko ら(1)のデータにゲノム情報を対応させ Symbiont-symbiont network 解析を行い、AdiA、AdiC、AguA 及び AguD ホモログを保有する細菌群の糞便試料中での共存について検討した。
**【結果と考察】***C. youngae* 或いは *F. varium* を *En. faecalis* と混合培養した結果、*C. youngae* 単独培養時の 1.5 倍、*F. varium* 単独培養時の 28 倍の Put が産生された。ノトバイオートマウス実験では、*F. varium* と *En. faecalis* 混合定着群の糞便中 Put 濃度は *F. varium* 単独定着群の 2 倍で、*En. faecalis* 単独定着群の 28 倍であった。16S の OTU データと照合できた 84 菌種を対象にした Symbiont-symbiont network 解析では、AdiA 或いは AdiC 保有細菌と AguA 或いは AguD 保有細菌は一部の菌種が共存していた。以上から、*E. coli* と *En. faecalis* 以外にも AdiA と AdiC 保有細菌と AguA と AguD 保有細菌が腸内に存在すれば、Put が産生されていると考えられる。
(1)Yatsunenko T, et al. *Nature* 486, 222-227, 2012.

Polyamine, Putrescine, Intestinal micobiome

講演番号：3C25p10
講演日時：3 月 19 日 16:25～ C 校舎 25 会場

放線菌 *Streptomyces lividans* による UV 吸収物質シノリンの効率生産
Production of UV-absorbing compound Shinorine by recombinant *Streptomyces lividans*
○山本 省吾[1]、松本 淳[1]、曽田 匡洋[1]、池田 治生[2]、劉 暁麗[1] ([1]長瀬産業株式会社、[2]北里大・北里生命研)
○Shogo YAMAMOTO[1], Jun MATSUMOTO[1], Masahiro SOTA[1], Haruo IKEDA[2], Xiaoli LIU[1] ([1]NAGASE & CO.,LTD, [2]Kitasato Inst. for Life Science, Kitasato Univ.)

*Streptomyces* 属細菌に代表される放線菌は、抗生物質をはじめとする２次代謝産物を生産することでよく知られている。放線菌の生産する物質は多岐に渡っており、非常に複雑な構造を有する物質の生産報告も多く、近年においても新規物質の発見が報告され続けている。有用物質を微生物により生産し工業的に利用する上で、放線菌の持つ物質生産能は他の工業微生物と比較して大きなアドバンテージと考えられる一方で、目的物質を高効率生産するための基盤の構築が必須の課題である。

我々は現在、独自の放線菌技術である“Ｎ－ＳＴｅＰＰ®”により、*S. lividans* を用いてタンパク質生産およびバイオケミカル生産に取り組んでいる。一方北里大学では、放線菌 *S. avermitilis* 大規模染色体欠失株であるＳＵＫＡ株を用いてマイコスポリン様アミノ酸（ＭＡＡｓ）の１種、シノリンを生産する方法を見出している[*1]。

ＭＡＡｓは、天然に存在するＵＶ吸収物質の一種であり、特にＵＶ－Ａ領域に対して非常に高い吸収能を示すことから、抗光老化素材としての利用が期待されている。一方で、ＭＡＡｓは紅藻類やサンゴなど一部の海洋生物中に存在するものの、天然における存在量が非常に少ないため、精製品を用いた物性や効果の検証例等の報告は少ない。さらに製品としては、ＭＡＡｓを含んだ海草抽出物を利用したものが存在するものの供給面や価格面の課題がある。

ＭＡＡｓはペントースリン酸経路の中間代謝物であるセドヘプツロース-７-リン酸から４種類の酵素で生合成される。これまで、ＭＡＡｓの生合成遺伝子を大腸菌や酵母で発現させＭＡＡｓの生産を試みた報告はあるが、生産量は決して高くない。これまで我々は、放線菌を用いたＭＡＡｓの高効率微生物生産を目指して検討を行っており、本発表では *S. lividans* を宿主としたＭＡＡｓ生産について報告する[*2]。

*1 *Appl. Environ. Microbiol.* (2014) **80**:16 5028-5036.
*2 特許第５９２７５９３号 微生物を用いたマイコスポリン様アミノ酸を生産する方法

*Streptomyces*, Shinorine, UV

講演番号：3C25p11
講演日時：3 月 19 日 16:50～ C 校舎 25 会場

麹菌群の 14-deacetyl astellolide A (14-DAA)と 14-deacetyl astellolide B (14-DAB)の生産性に関する研究

Productivity of 14-deacetyl astellolide A (14-DAA) and 14-deacetyl astellolide B (14-DAB) on Aspergillus oryzae strains

○齊藤 亮太[1]、梅尾 美幸[1]、織田 健[1]、篠原 靖智[2]、小山 泰二[2]、岩下 和裕[1,3] ([1]酒総研、[2]野田産研、[3]広大院・先端研)

○Ryota SAITO[1], Miyuki UMEO[1], Ken ODA[1], Yasutomo SHINOHARA[2], Shinji KOYAMA[2], Kazuhiro IWASHITA[1,3] ([1]NRIB, [2]NISR, [3]Hiroshima Univ.)

**【目的】**麹菌は他の糸状菌と同じように様々な 2 次代謝物を生産するが、その種類、生産条件、生産量に関しては十分に明らかになっていない。14-DAA は 2012 年に Rank. C ら、14-DAB は 2015 年に Ren. R らによって報告された麹菌が生産する二次代謝物であり、それぞれ astellolide A、astellolide B の脱アセチル化された化合物である。さらに近年、篠原らは麹菌の chromatin-remodeling factor の 1 つである *ccl1* 遺伝子破壊株において 14-DAA と 14-DAB の生産量が増加することを報告した。また、14-DAB がガン細胞に対して抗増殖性活性を示すことを報告した。しかし、麹菌群全体での 14-DAA と 14-DAB の生産性や醸造条件下での生産性などの詳細な解析はなされていない。そこで本研究では、麹菌群の 14-DAA、14-DAB の生産性を明らかにすることを目的とした。

**【方法・結果】**まず麹菌 RIB40 株を 3 種類の寒天培地、米麹の条件で 2、4、6、8 日間培養し、14-DAA、14-DAB の生産性を検討した。その結果、培地組成により両化合物の生産量は異なったが、いずれも培養 2 日目以降の生産量は変わらなかった。また、どの培地でも 14-DAB より 14-DAA の生産量が多かった。米麹条件でも両化合物の生産性が確認されたが、その量は寒天培地と比較すると 10 分の 1 以下であった。また、製麹 4 日目で生産量が最大となり以降はほとんど変化がなかった。次に、麹菌群全体について検討するために、13 系統の代表株について寒天培地と米麹の条件で生産性を評価した。寒天培地は、RIB40 株で両化合物の最も生産性が高かった YES 寒天培地を用いた。その結果、13 系統のうち 9 株で生産性が見られ、4 株については生産が見られなかった。生産が見られた株では、菌株により 14-DAA と 14-DAB の比率が異なっていた。また、米麹(培養期間 2、6 日)での生産量は RIB40 株と同様寒天培地に比べ低かった。さらに、日本全国から選抜した 32 種の市販清酒中の 14-DAA、14-DAB の検出、定量を試みたが、両化合物は検出されなかった。以上の結果から、麹菌の 14-DAA と 14-DAB の生産性は生育環境に依存することが考えられた。また、両化合物を生産しない株に関しては、クラスター遺伝子の変異や欠損などが起こっている可能性が考えられた。

Aspergillus oryzae, secondary metabolite

講演番号：3C25p12
講演日時：3 月 19 日 17:05～ C 校舎 25 会場

油性酵母（*Lipomyces starkeyi*）によるアルテミシニン前駆体の生産
Production of artemisinin precursors by the recombinant oleaginous yeast, *Lipomyces starkeyi*
○小島 基[1]、鈴木 宗典[1]、金本 浩介[1]、石井 純[2]、近藤 昭彦[2]、播本 孝史[1]（[1]神戸天然物化学(株)、[2]神戸大院・科学技術イノベーション）
○Motoki KOJIMA[1], Munenori SUZUKI[1], Hirosuke KANAMOTO[1], Jun ISHII[2], Akihiko KONDO[2], Takashi HARIMOTO[1] ([1]KNC Laboratories Co., Ltd., [2]Grad.Sch.Sci.Technol.Innov., Kobe Univ.)

油性酵母(*Lipomyces starkeyi*)は一般的な出芽酵母に比べ脂肪酸の生産量が多いことから、近年、バイオディーゼル生産宿主として盛んに研究されている。しかしながら、バイオディーゼル以外の化合物の生産報告はほとんどないことから、演者らは *L. starkeyi* による物質生産の可能性を探ることにした。脂肪酸生産における重要な中間体がアセチル CoA であることから、同様にアセチル CoA を経由するテルペノイドに着目し、本研究では抗マラリア治療薬アルテミシニン（セスキテルペノイド）の前駆体生産を検討することにした。

*L. starkeyi* ではステロイド以外のテルペノイドが検出されていないことから、セスキテルペノイド生合成関連遺伝子であるクソニンジン(*Artemisia annua*)由来のアモルファ-4,11-ジエン合成酵素 (ADS) 遺伝子が *L. starkeyi* 由来 Translation elongation factor (TEF) プロモーター制御下で発現するプラスミドを作製した。弊社で最適化した形質転換法を用いて *L. starkeyi* へ作製したプラスミドを導入し、代謝産物を GC-MS により分析した。その結果、ADS 発現株においてセスキテルペンと推定される複数のピークが新たに検出された。アモルファ-4,11-ジエン標準品と保持時間及びフラグメントパターンを比較したところ、主生成物をアモルファ-4,11-ジエンと同定した。

セスキテルペンの化学構造の多様性はシトクロム P450 が関与していることが多い。そこで、アルテミシニン生合成に関与する *A. annua* 由来アモルファ-4,11-ジエン酸化酵素(CYP71AV1)遺伝子および、P450 酸化反応に必要な電子の供給源としてミヤコグサ(*Lotus japonicus*)由来 NADPH-シトクロム P450 還元酵素(LjCPR)遺伝子を導入した。GC-MS 分析の結果、ADS 遺伝子に加えてこれらの遺伝子を導入した株で新たなピークが検出され、標準品と比較したところ、アルテミシニックアルコールが生産されていることを確認した。

また、アモルファ-4,11-ジエンを含むテルペノイド全般の生産性向上につなげることを目的として、*L. starkeyi* のメバロン酸経路の改変を試みた。出芽酵母のメバロン酸経路において、生合成の律速段階である HMG-CoA 還元酵素の遺伝子をアモルファ-4,11-ジエン生産株へ導入した結果、アモルファ-4,11-ジエンの培養液当たりの生産量が約 10 倍に向上した。この結果から、*L. starkeyi* においても HMG-CoA からメバロン酸が生成される還元反応が出芽酵母と同様に律速であると推定された。

*L. starkeyi* を宿主としてアルテミニシン前駆体（セスキテルペノイド）の生産に世界で初めて成功し、代謝工学による生産性の向上が可能であった。このことから、*L. starkeyi* はバイオディーゼル以外の有用物質生産、とりわけテルペノイド類高生産の有望な宿主となり得ることが明らかとなった。この研究は、経済産業省委託事業『革新的バイオマテリアル実現のための高機能化ゲノムデザイン技術開発』の一部として実施した。

Lipomyces starkeyi, Sesquiterpenoid, Cytochrome P450

発表責任者：鈴木　宗典（m_suzuki@kncweb.co.jp）

講演番号：3C25p13
講演日時：3 月 19 日 17:20～ C 校舎 25 会場

# 非リボソームペプチド rufomycin の生合成に関与するチロシン 3-ニトロ化酵素の同定

# Identification of the tyrosine 3-nitration enzyme involved in the biosynthesis of the nonribosomal peptide rufomycin

○冨田 宏矢[1,2]、勝山 陽平[1,2]、大西 康夫[1,2] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]JST, CREST)
○Hiroya TOMITA[1,2], Yohei KATSUYAMA[1,2], Yasuo OHNISHI[1,2] ([1]Grad. Sch. Agric. and Life Sci. Univ. of Tokyo, [2]JST, CREST)

【背景・目的】放線菌を含む多数の微生物は、抗生物質をはじめとする多種多様な二次代謝産物を合成する。二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターにはしばしばユニークな反応を触媒する酵素が見出されることから、酵素学的に非常に興味深い研究対象である。本研究で着目した rufomycin は、放線菌 *Streptomyces atratus* DSM 41673 株が生産する 7 個の L-アミノ酸からなる環状ペプチドである[1)]。その構成アミノ酸に 3-ニトロチロシンが含まれることから、rufomycin の生合成遺伝子クラスターには Tyr をニトロ化する酵素がコードされることが予想された。過去に Trp をニトロ化する放線菌由来 TxtE が報告されているが[2)]、Tyr のニトロ化反応を触媒する酵素は前例がないことから、我々は本酵素の同定を試みた。これまでに本菌のドラフトゲノム解析を行い、rufomycin の生合成を担うと推定される遺伝子クラスター (*ruf* クラスター) を発見した。本クラスター中には、一酸化窒素合成酵素 (NO synthase) 遺伝子とオペロンを形成すると考えられるシトクロム P450 遺伝子 (*rufO*) が存在することから、この遺伝子にコードされる P450 が Tyr のニトロ化を担うと考え、その機能解析を進めた。
【結果・考察】*rufO* 遺伝子の rufomycin 生合成への寄与を調べるため、CRISPR/Cas システムを利用した遺伝子組換えにより、*rufO* 遺伝子破壊株 (Δ*rufO*) を作製した。野生株が rufomycin を高生産する培地でΔ*rufO* 株を培養したところ、rufomycin の生産は完全に消失した。またニトロ基のない rufomycin のような生合成前駆体の蓄積も確認されなかった。一方で、3-ニトロチロシンを添加した培地を用いて同様の実験を行ったところ、rufomycin の生産は野生株と同程度にまで回復した。この結果から、*rufO* は rufomycin の生産に必須であり、予想通り 3-ニトロチロシンの供給を担うことが明らかとなった。また前駆体の蓄積が見られなかったことから、Tyr のニトロ化は rufomycin のペプチド骨格形成の前段階またはその過程で行われることが示唆された。次に生化学的解析を進めるため RufO 組換えタンパク質を調製した。C 末端に $His_6$-tag を付与した RufO を大腸菌内で大量生産し、Ni アフィニティカラムを用いて精製タンパク質を得た。RufO は、P450 酵素群に特徴的な性質である一酸化炭素の結合による 450 nm の極大吸収を示し、活性型のタンパク質が得られたことがわかった。Tyr を基質に用いて *in vitro* 酵素反応を試みたところ、RufO によって 3-ニトロチロシンの生産が確認された。以上のことから、RufO は遊離の Tyr をニトロ化する酵素であり、rufomycin は 3-ニトロチロシンを利用して構築されることが明らかとなった。

[1)] Shibata *et al.*, ***Agric. Biol. Chem.*** (1962), [2)] Barry *et al.*, ***Nat. Chem. Biol.*** (2012)

nonribosomal peptide, cytochrome P450, Streptomyces

講演番号：3C25p14
講演日時：3 月 19 日 17:35～ C 校舎 25 会場

食後高血糖抑制物質 DNJ 及び他アザ糖生産量の、*B. amyloliquefaciens* 菌株間における差異
The comparison between *B. amyloliquefaciens* strains in 1-deoxynojirimycin (DNJ) and azasugars production.

○山岸 賢治[1]、高須 蒼生[2]、伊藤 隼哉[2]、池田 亮一[3]、木村 俊之[1]、仲川 清隆[2]、宮澤 陽夫[4]([1]農研機構食品研究部門、[2]東北大農、[3]（株）旭松食品、[4]東北大未来科学技術共同研究センター)
○Kenji Yamagishi[1], So Takasu[2], Junya Ito[2], Ryoichi Ikeda[3], Toshiyuki Kimura[1], Kiyotaka Nakagawa[2], Teruo Miyazawa[4] ([1]National Food Research Institute (NARO), [2]Tohoku univ., [3]Asahimatsu Foods Co., Ltd, [4]New Industry Creation Hatchery Center, Tohoku univ.)

【目的】糖尿病患者の増加や若年化に代表されるように、生活習慣病が深刻な社会問題となりつつあり、それを予防する効果を持つ機能性糖質への期待は大きい。小腸からの糖吸収を競争的に阻害し、食後高血糖を大幅に抑制する作用を持つ機能性糖質（1-デオキシノジリマイシン、DNJ）は、桑葉に特徴的に含まれていることから、桑を含む食品として上市されている。しかしながら桑葉は生産量が限られており、かつ含有量も低いため、安価かつ高品質な DNJ を供給する上で、微生物を供給源とすることは産業的に有利である。そのため我々はこれまで、DNJ の生理機能、吸収動態を研究すると共に、枯草菌の近縁種であり、食品用酵素の大量生産に用いられている *Bacillus amyloliquefaciens* からの DNJ 生産を検討してきた[1)]。また、DNJ はグルコースの環内酸素原子がイミノ基で置換されたアザ糖であるが、桑葉は DNJ 以外に多種のアザ糖を含んでいる。微生物においても桑葉と異なるアザ糖が DNJ と共に生産されるが、そのような夾雑物は最小限であることが望ましい。そこで本研究では、各種培養条件における *B. amyloliquefaciens* 菌株間の DNJ、及び副生されるアザ糖（2-アミノマンニトール（ADM））の生産量を調査し、DNJ の生産量が高く、かつ ADM 含有率が極力低くなる条件を調べた。

【方法】*B. amyloliquefaciens* DSM7 株他、12 種類の菌株を用いて種々の培養条件（C 源、N 源、培養温度、ファーメンター培養等）を検討した。培養上清中の DNJ、及び ADM の生産量は、蛍光修飾後に HPLC を用いて定量した。

【結果】ラクトース、硫酸アンモニウムを唯一の C 源、N 源とする化学合成培地を用いた場合、DSM7 株が最も DNJ 生産を促進し、培養 5 日後の生産量は 1150mg/L 培地に達した。ADM の蓄積量は DNJ の 1/6 程度であった。他の菌株もラクトースを資化して良好に増殖したが、数株が 100～300mg/L 程度の生産量を示し、極微量しか DNJ を生産しない菌株も多く存在した。可溶性デンプンを C 源として用いた場合、DSM7 株の DNJ 生産量は 400mg/L に低下したが、ADM 蓄積量も DNJ の 1/15 と大きく低下した。他の菌株では、一株が 100mg/L 程度 DNJ を生産したが、他菌株の DNJ 生産量は極微量であった。

(1) Onose S., Ikeda R., Nakagawa K., Kimura T., Yamagishi K., Higuchi O. and Miyazawa T. Production of the α-glycosidase inhibitor 1-deoxynojirimycin from *Bacillus* species. *Food Chem.*, 138(1), 516-523 (2013).

1-deoxynojirimycin (DNJ), *Bacillus amyloliquefaciens*, Azasugars

発表責任者：山岸賢治（yamagisi@affrc.go.jp）

講演番号：3C25p15
講演日時：3 月 19 日 17:50～ C 校舎 25 会場

ジャトロファ搾油残渣を培養基質とした紅麹菌発酵産物の抗酸化能
Studies on antioxidant capacity of *Jatropha* seed cake fermented by *Monascus* fungi
○仲眞 弘樹[1]、橘 信二郎[1]、SUNTORNSUK Worapot[2]、名城 龍[1] ([1]琉大農、[2]キングモンクット工科大学)
○ Hiroki NAKAMA[1], Shinjiro TACHIBANA[1], Worapot SUNTORNSUK[2], Ryu NASHIRO[1] ([1]Ryukyu Univ, [2]KMUTT)

【背景・目的】
ジャトロファ（*Jatropha curcas*）は中南米原産の熱帯性植物であり、熱帯から亜熱帯地域の広範囲で栽培されている。ジャトロファ種子の仁には豊富な油分が含まれ、採油効率の高さや非食用植物であることからバイオ燃料の原料として注目されている。搾油後の残渣はタンパク質含量が高く、家畜飼料として期待されている。しかし、ホルボールエステルやトリプシンインヒビター、レクチン、フィチン酸などの有毒成分も含まれるため、一部は作物の有機肥料として利用されているものの、大部分は廃棄されている。紅麹菌（*Monascus* 属）は、固体培養において多様な生理活性を有する二次代謝産物と分泌型加水分解酵素群を産生することが報告されている。そこで、我々はジャトロファ搾油残渣を培養基質として用い、紅麹菌で発酵することで、発酵産物の生理活性が向上すると考えた。本研究では、ジャトロファ搾油残渣の紅麹菌発酵産物の抗酸化能について調べた。
【方法】
天日乾燥させた搾油後のジャトロファ種子残渣を粉砕し、ヘキサン脱脂処理して乾燥させた。水分含量を 70%に調整し、オートクレーブ滅菌して培養基質として用いた。紅麹菌 31 株をそれぞれ植菌し 31℃で 14 日間静置培養した。培養物の 3 倍容の蒸留水で水溶性画分を抽出し、ORAC 法及び DPPH 法により抗酸化活性を調べた。抽出物の抗酸化能は Trolox 当量（TEAC 値）で比較した。コントロールとして、紅麹菌非接種の培地から同様の手順で抽出物を調製した。紅麹菌発酵産物およびコントロールの各抽出物を各種カラムクロマトグラフィーにより分画し、逆相 HPLC クロマトの溶出プロファイルと抗酸化活性を比較した
【結果・考察】
脱脂処理したジャトロファ種子搾油残渣を紅麹菌で発酵することにより、水抽出画分の抗酸化能がコントロールに比べて最大約 2.9 倍高くなった。逆相 HPLC 分画により、コントロールと比較して抗酸化活性の高い画分が紅麹発酵産物で得られた。クロマトのプロファイルを比較すると、主要なピークで溶出面積が増大しており、発酵産物に特有のピークも確認できた。これらの結果より、ジャトロファ種子の搾油残渣を紅麹菌で発酵させることで抗酸化能を向上させることができることがわかった。

*Jatropha*, antioxidant capacity, *Monascus*

講演番号：3C26a01
講演日時：3 月 19 日 09:20～ C 校舎 26 会場

# 合成生物学的手法によるエチレン生成シアノバクテリアの改良
# Improved enzyme complex expression for higher bio-ethylene production by a cyanobacterium

○神藤 定生[1]、中尾 領亜[2]、坂本 拓都[2]、細田 晃文[2]、田村 廣人[2]([1]名城大理工、[2]名城大農)
○ Sadanari JINDOU[1], Reia NAKAO[2], Takuto SAKAMOTO[2], Akifumi HOSODA[2], Hiroto TAMURA[2] ([1]Meijo Univ., [2]Meijo Univ. Fac. of Agriculture)

脱石油依存社会を可能にする新規なエチレン製造法を確立するため、我々は二酸化炭素から光合成的にエチレンを生産するシアノバクテリアを構築した。すなわち、植物由来のエチレン生合成に関わる 1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸(ACC)合成酵素(ACS)および ACC 酸化酵素(ACO)を、セルロソームエンジニアリングで複合体化させ、Ethylenome SOC2 とした。これを合成生物学の手法によりシアノバクテリアへ導入した結果､本細菌はバイオエチレンを 3.4 nl/ml/O.D.$_{730}$/h の効率で生産した。また、複合体の形成により 3.7 倍高いバイオエチレン合成活性を得た(Jindou *et al., ACS Synth. Biol.*, 2014)。

いっぽう、さらなるバイオエチレン生産効率の向上を目的として、われわれは Ethylenome の酵素組成の変更による以下の反応系最適化を行ってきた。具体的には、

①Ethylenome SOC2 を構成する 2 種のキメラ酵素サブユニット(ACS-Ctdoc および ACO-Acdoc)の複合体内モル比が 1 : 2 となるよう、これに対応するキメラ骨格タンパク質 Cip3B を保持するバイオエチレン生産株 SOC3B 株を構築した。組換え体からのバイオエチレン生産量をガスクロマトグラフィー(GC)で定量した結果、既存の SOC2 株と比較して、1.7 倍高いバイオエチレン生産量増加を示した。

②メチルチオアデノシン(MTA)による ACS の活性阻害を回避させるため MTA ヌクレオシダーゼ(MTAN)を既存の SOC2 株へ組み込んだバイオエチレン生産株 SOC3D2 株を構築した。結果、既存の SOC2 株と比較して、SOC3D2 株は 1.9 倍のバイオエチレン生産量増加を観察した。

以上で得られた､酵素の組成変更によるバイオエチレン生産効率の上昇理論値より､ACS:ACO:MTAN=1:2:1 の各酵素モル比を持つ酵素複合体は SOC2 株比 3 倍以上のバイオエチレンを生産可能であることが示唆された。そこで、これを検討する事を目的として、本研究では新規の Ethylenome SOC4 を構築し、これを保持するシアノバクテリアのバイオエチレン生産効率を GC で定量したので、この詳細を報告する。

Ethylene, Cyanobacteria, Synthetic biology

発表責任者：神藤定生（sjindou@meijo-u.ac.jp）

講演番号：3C26a02
講演日時：3 月 19 日 09:35～ C 校舎 26 会場

好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* HTA426 において誘導される変異誘発機構の解析
Frequent mutagenesis induced by growth suppression in the thermophile *Geobacillus kaustophilus* HTA426
○鈴木 宏和[1]、竹谷 達成[2]、小林 淳平[1]、大城 隆[1] ([1]鳥取大院・工、[2]鳥取大・工)
○Hirokazu SUZUKI[1], Tatsunari TAKETANI[2], Jyumpei KOBAYASHI[1], Takashi OHSHIRO[1] ([1]Grad. Sch. Eng., Tottori Univ., [2]Dept. Biotechnol., Tottori Univ.)

【目的】我々は，*Geobacillus* 属好熱菌の高度利用を目的とし，*Geobacillus kaustophilus* HTA426 を中心とした *Geobacillus* 属好熱菌の応用微生物学的研究を広く行っている。その一環として，HTA426 株由来の高変異性好熱菌で耐熱化変異酵素の遺伝子を発生させる手法を研究しているが，その過程において *G. kaustophilus* が高頻度に抗生物質（リファンピシンおよびストレプトマイシン）耐性株を発生させることを見出した。本大会では，そのメカニズムに関する新たな知見を含めて報告する。
【結果と考察】DNAシークエンス解析から，*G. kaustophilus*のリファンピシン耐性株は*rpoB*遺伝子変異によって，ストレプトマイシンは*rpsL*変異によって発生することが見出された。つづいて，当該変異発生が自発的変異であるか誘導型変異であるかを確認するために，Luria–Delbrückテストを行った。*G. kaustophilus* HTA426の実験室モデル株MK370を，定常期後期まで培養（60°C）し，リファンピシンもしくはストレプトマイシンを含む寒天培地に塗布した。発生した耐性株のコロニー数を分析した結果，当該変異発生は主に自発的変異によることが示唆された。ところが，MK370株を菌体濁度が1.0の時（増殖期），それから2時間（定常期初期），4時間（定常期中期），および6時間後（定常期後期）まで培養し，リファンピシンもしくはストレプトマイシンを含む寒天培地に塗布したところ，抗生物質耐性株は増殖期細胞から高頻度に発生した。MK370株と耐性株の増殖速度は，ほとんど同じであったことから，液体培養中の増殖期に発生した耐性株が定常期において減少したとは考えにくく，よって増殖期細胞からの耐性株発生は誘導型変異に大きく依存したと考えられる。興味深いことに，DNA修復系遺伝子の1つである*mfd*を破壊すると，増殖期細胞と定常期細胞からの耐性株発生頻度が同等になった。本結果は，増殖期細胞が生育阻害ストレスを受けると*mfd*遺伝子の機能が抑制され，細胞内変異率が上昇することを示唆している。実際に，増殖期細胞がストレプトマイシンによる生育阻害を受けると，*mfd*転写物は急激に減少した。増殖期細胞からの耐性株発生の温度依存性を調べたところ，*G. kaustophilus*の増殖に適した温度（55～65°C）で高く，70°Cでは低かった。よって当該耐性株発生は，変異発生が頻繁な高温環境というよりも，活発な細胞活性に依存していると考えられる。以上の結果は，*G. kaustophilus*からの耐性株発生がレトロ変異機構に依存していると仮定すると矛盾なく説明できる。また同様な増殖期特異的変異誘発は他の*Geobacillus*属好熱菌においても見られ，その好熱菌における分布が示唆された。本研究は生研センターイノベーション創出事業および農食研究推進事業の支援を受けて行った。

*Geobacillus*, mutagenesis, thermophile

発表責任者：鈴木宏和（hirokazusuzuki@bio.tottori-u.ac.jp）

講演番号：3C26a03
講演日時：3 月 19 日 09:50～ C 校舎 26 会場

好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* HTA426 を宿主とする遺伝子発現システムの改良
Gene expression systems improved for versatile protein productions in the thermophile *Geobacillus kaustophilus* HTA426
○水野 樹[1]、村田 くるみ[2]、八木 寿梓[3]、大城 隆[1]、鈴木 宏和[1]（[1]鳥取大院・工、[2]鳥取大・工、[3]鳥取大・工・GSC）
○ Tatsuki MIZUNO[1], Kurumi MURATA[2], Hisashi YAGI[3], Takashi OHSHIRO[1], Hirokazu SUZUKI[1] ([1]Grad. Sch. Eng., Tottori Univ., [2]Faculty of Eng., Tottori Univ., [3]GSC, Faculty of Eng., Tottori Univ.)

【目的】我々は，好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* HTA426 の遺伝子改変技術を広く開発しており，これまでに本好熱菌で機能する遺伝子発現プラスミド（pGKE75）を構築した。これは大腸菌高コピープラスミド（pUC18）を基盤とした *Escherichia coli–Geobacillus* シャトルプラスミドで，その構成要素には pBST1 由来レプリコン，接合伝達起点 *oriT*，高温機能性カナマイシン耐性遺伝子 *TK101*，そして発現プロモーター$P_{gk704}$が含まれる。ところが，大腸菌においても$P_{gk704}$が機能してしまうことを理由に，pGKE75 にクローニングできない遺伝子が数多く見出され，その有用性を制限する大きな原因となっている。そこで本研究では，クローニングした遺伝子が大腸菌細胞内で発現せず，その一方で *G. kaustophilus* HTA426 細胞内では高発現する新規な発現プラスミドを構築した。
【実験】pGKE75 の pBST1 レプリコンと *TK101* 領域を PCR で増幅し，*Bam*HI で切断した。大腸菌低コピープラスミド（pACYC）の p15A レプリコンを増幅し，*Bgl*II で切断した。得られた２断片を連結することで pGKE98 を構築し，その *Mun*I サイトに *oriT* 領域を，また *Bam*HI サイトにはマルチクローニングサイト（*Hin*dIII–*Sph*I–*Bam*HI）を導入した。つづいて得られたプラスミドの *Hin*dIII–*Sph*I サイト間に$P_{gk704}$を導入し，pGKE109 を得た。pGKE109 および pGKE75 の$P_{gk704}$下流には黄色蛍光タンパク質遺伝子を導入した。得られたプラスミドで大腸菌と *G. kaustophilus* を形質転換し，それらの細胞内で産生される黄色蛍光タンパク質を定量および比較した。
【結果と考察】大腸菌内における遺伝子発現を抑制するために，p15A レプリコンを基盤とした新規シャトルプラスミド pGKE109 を構築した。大腸菌細胞内における pGKE109 からの遺伝子発現は，pGKE75 からよりも低く（約 1/40），その一方で *G. kaustophilus* 細胞内における遺伝子発現は両プラスミドにおいて同程度であった。pGKE109 は，大腸菌と *G. kaustophilus* 用の薬剤選択マーカーが *TK101* に統一されており，プラスミドが小型化されている。よって，pGKE109 は pGKE75 よりも大きなサイズの遺伝子をクローニングできるかもしれない。なお *TK101* は大腸菌における機能性がやや悪かったが，大腸菌の形質転換体を的確に選択できた。また *G. kaustophilus* へのプラスミド導入には接合伝達を利用しているが，強力な接合伝達ヘルパーpRK2013 を用いて pGKE109 は効率よく *G. kaustophilus* に伝達された。この現象は pGKE75 にはなかったもので，pGKE109 の長所の 1 つといえる。以上の結果は，pGKE109 が新たな *G. kaustophilus* 遺伝学的ツールとして有用であること，さらには他 *Geobacillus* 属細菌でも有用なツールとして機能する可能性を示唆している。

*Geobacillus*, thermophile, expression vector

講演番号：3C26a04
講演日時：3 月 19 日 10:05～ C 校舎 26 会場

# ピキア酵母用再利用可能ベクター
# A new efficient vector for repeated use in *Pichia pastoris*

○渋井 達郎、原 宏佳、坂口 大介（日本獣医生命科学大学)
○TATSURO SHIBUI, HIROYOSHI HARA, DAISUKE SAKAGUCHI (NVLU)

原核生物、酵母、カビ、昆虫細胞、動物細胞、植物細胞、トランスジェニック植物・動物などが遺伝子工学による目的タンパク質生産宿主として使用されているが、これら宿主を利用した目的遺伝子産物（タンパク質）の量産系には、原則として以下のような発現のための共通の因子が必要となる。

１．転写活性が高く、制御の容易な転写プロモーター配列と転写の read-through を防ぐための転写終結（ターミネーター）配列　２．翻訳開始効率の良くするための配列（5’Cap 構造、IRES、SD 配列等）の目的遺伝子上流への配置　３．翻訳効率の良いコドンの利用とその効率の良い配置

これらの他、目的遺伝子のコピー数を増加させることにより、目的遺伝子産物の量を増加させることができることは、種々報告されている[1-3]。

上記宿主の中で、ピキア酵母は増殖力およびタンパク質生産能力が優れているため、組換え宿主として様々なタンパク質の生産に利用されている。当研究室では、目的遺伝子のコピー数をベクター上で増やす方法を用い、ピキア酵母での目的タンパク質の生産効率向上の検討を行ったが、ベクター上で目的遺伝子数を増やした場合、導入遺伝子断片が巨大になるため、エレクトロポレーション法による細胞内へのインタクトな遺伝子の導入効率は著しく低下することを見出している[4]。よって、ピキア酵母を工学的に改変し、同じベクターを繰り返し導入できる系を開発し、既に報告している[5]。

今回、*Cre*-変異 *lox*P システムを利用し、様々なピキア酵母株に使用可能な再利用可能汎用ベクター系を開発したので報告する。

1) T. Shibui *et.al*. “A methods for overproduction of a protein of a target gene in Escherichia coli.” Agric. Biol. Chem., 52, 2235-2241 (1988)

2) T. Shibui *et.al*. “High-level expression of human proapolipoprotein A-1 in Escherichia coli using expression plasmids containing tandemly polymerized proapolipoprotein A-1 structural genes.” Applied Microbiology and Biotechnology, 31, 518-523 (1989)

3) M. Kito *et.al.* “Construction of engineered CHO strains for high-level production of recombinant proteins.” Applied Microbiology and Biotechnology, 60, 442-448 (2002)

4) T Shibui *et,al.* “Construction and effects of tandem-repeat expression genes for *Pichia pastoris,* and their incorporation efficiencies and stabilities by electroporation.” CIBTech Journal of Biotechnology, 3, .25-35 (2014)

4) T Shibui *et,al.* “A New Efficient Vector for Repeated Use in *Pichia pastoris*.” International Journal of Research Studies in Biosciences, 3(9), 72-79 (2015)

P. pastoris, Cre/loxP, AOX1 promoter

発表責任者：渋井達郎（tshibui@nvlu.ac.jp）

講演番号：3C26a05
講演日時：3 月 19 日 10:20～ C 校舎 26 会場

# 酵母の胞子を利用したカプセル化クレアチニナーゼ及びクレアチナーゼの作成
# Production of encapsulated creatininase and creatinase using yeast spores

○中西 秀樹、KONG Jun、高 暁冬（江南 大・生物工程）
○Hideki NAKANISHI, Jun KONG, Xiao-Dong GAO (Jiangnan Univ.)

【背景･目的】

二倍体の出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は栄養飢餓、特に窒素源を枯渇させた条件下において胞子を形成する。*S. cerevisiae* の胞子には栄養増殖細胞にはないキトサン層、ジチロシン層といった構造が存在する。このユニークな構造により、胞子壁はサイズ依存的なバリアーとして働いている。例えば、単糖やオリゴ糖など比較的小さな分子は胞子壁を通過できるのに対して、タンパク質などの大きな分子は通過することができない。このため、胞子で発現された可溶性の分泌タンパク質はそのペリプラズム内に保持される。この性質を利用して、我々は分泌型酵素を発現させた胞子が酵素カプセルとして利用できることを見出した。さらに、胞子壁の構造がルーズになる変異によって、カプセル化酵素の活性を高められることも見出している。

クレアチニナーゼ、クレアチナーゼはそれぞれクレアチニンをクレアチンに、クレアチンを尿素（及びサルコシン）に加水分解する酵素であり、主に医療診断用酵素として血中におけるクレアチニンの定量に利用されている。今回我々は、これらの酵素について胞子を用いたカプセル化を試みた。

【方法】

*Pseudomonas* sp. PS-7 由来のクレアチニナーゼ及び、*Pseudomonas putida* 由来のクレアチナーゼをそれぞれ酵母において恒常的に発現させ、胞子における活性を調べた。また、これらの酵素を同時に発現させた胞子と、個々に発現させた胞子を混合した場合について、クレアチニンから尿素への二段階からなる加水分解を行い比較した。

【結果･考察】

クレアチニナーゼ、クレアチナーゼ共に胞子壁内に局在化させても活性を有しており、これらの酵素を胞子においてカプセル化できることがわかった。胞子内にカプセル化された酵素は、細胞外に分泌された可溶型酵素よりも熱やプロテアーゼ処理に対する耐性が高い。さらに、両酵素を個々に発現させた胞子を混合した場合よりも、一つの胞子に共発現させた場合の方がクレアチニンから尿素への二段階の分解を効率良く行えることを見出した。この結果は、胞子において複数の酵素を同時にカプセル化できることを示しているのと共に、 複数の反応が胞子壁内において連続して起こり得ることを示唆している。

enzyme encapsulation, yeast spore, creatininase

発表責任者：中西　秀樹（hideki@jiangnan.edu.cn）

講演番号：3C26a06
講演日時：3 月 19 日 10:45～ C 校舎 26 会場

# 糸状菌由来の酵素遺伝子は大腸菌でどの程度発現するのか？
# Evaluation of foreign expression of fungal enzyme genes in E. coli

前田 秀可、島村 麻美子、○紙野 圭 (製品評価技術基盤機構)
Hideka MAEDA, Mamiko SHIMAMURA, ○Kei KAMINO (NITE)

微生物酵素の利活用における研究開発の初期段階では、その酵素が異種発現するのかどうかや、活性を調べるに足る発現量が得られるかどうかは戦略を考える上で大きな分かれ道となる。しかし既報の場合を除けばそれを予測することは困難である。NITE/NBRC は産業利用を指向した国内最大級の微生物保存組織であり、保有微生物の能力の利活用促進のための基盤整備も行っている。特に多様かつ膨大な株数の糸状菌を保有しているが、糸状菌酵素の多様性はバクテリアに比べて未だ活かされていないと考えている。それらの酵素遺伝子の研究開発のためには酵母や麹菌ホストで発現を試みるのが常道であるが、大腸菌ホストで発現してくれれば研究開発効率は上昇する。またバイオ技術に経験の浅い企業等の新たな参入を呼び込み、バイオ技術を活用する産業の裾野を広げる面でも重要な視点であると考える。NITE/NBRC では、バイオマス糖化酵素の研究開発に際して好熱性糸状菌ライブラリーの拡充と、それらの情報整備を進めてきた。一方、近年のバイオマス利用のブームにのって進められている公開糸状菌ゲノム情報も着実に増加している。まず、これらの多様な酵素の利活用を促進するため、大腸菌における異種発現の可否情報の整備について検討することとした。

好熱性糸状菌は分類学的には限られた系統に分類され、その生育温度もおよそ 60℃が上限であるが、常温近傍での高い効率を謳うバイオプロセスとしては、実質的な温度域を十分カバーしていると言える。ここでは、*Thielavia* sp.、*Chaetomium* sp.、*Myceliophthora sp.* の 3 株の有するラクトナーゼ遺伝子およびコドン最適化遺伝子の大腸菌（pET 系ベクター）における異種発現の可否と、発現タンパク質の酵素性状の解析を行ったのでそれらを報告し、このような基盤情報についてご意見を賜りたいと考える。なお本研究の一部は、「バイオ燃料事業化に向けた革新的糖化酵素工業生産菌の創製と糖化酵素の生産技術開発」の一貫として行われた。

expression, thermophilic, fungal enzymes

発表責任者：紙野　圭（kamino-kei@nite.go.jp）

講演番号：3C26a07
講演日時：3 月 19 日 11:00～ C 校舎 26 会場

# tRNA の稼働率に着目した物質生産性を向上させる方法

# The method of improving protein productivity based on the overload of tRNAs

○廣瀬 修一（長瀬産業株式会社）
○Shuichi HIROSE (NAGASE & CO., LTE.)

微生物を利用した組換えタンパク質大量生産技術は、学術研究だけでなく工業生産においても重要な課題である。１つの解決法として、宿主のレアコドンに対応するｔＲＮＡの供給量を増大させる方法が用いられる。この手法は、レアコドンの使用頻度が極端に高い異種タンパク質発現に有効である。しかしながら、同種タンパク質やレアコドンを含まないタンパク質に対しては適用できないため、これらのタンパク質の生産効率を向上させる発現技術が求められている。

本研究では、「ｔＲＮＡの稼働率」という概念を導入した[*1]。例えば、コドンＡＡＡに対応するｔＲＮＡの稼働率は、ゲノムにコードされる全遺伝子中のコドンＡＡＡの出現頻度に対するコドンＡＡＡに対応するｔＲＮＡ遺伝子数の比率から算出される。この稼働率を計算した結果、ｔＲＮＡによって大きなばらつきが見られた。従って、稼働率の高いｔＲＮＡの供給量を増大させることにより、タンパク質生産量が増大するのではないかと推測した。そこで本発表では、この仮説の検証を行った。

最初に、*Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ　ｌｉｖｉｄａｎｓ　１３２６*を宿主として検証を実施した。理論計算から同定された２個の稼働率の高いｔＲＮＡ遺伝子を宿主に導入した。この株における、複数の同種タンパク質、異種タンパク質、およびケミカル生産に与える影響を評価した。宿主改変には、我々独自のＮ－ＳＴｅＰＰ®技術を利用した。その結果、多くの例で生産量増加が確認された。また、稼働率の高いｔＲＮＡとレアコドンの併用でも、生産性への効果が見られた。次に、大腸菌を宿主として検証したところ、同様に有効な効果が得られた。以上の結果より、宿主への稼働率の高いｔＲＮＡの導入はタンパク生産量増大させると共に、ケミカル生産にも有効な手法であることが示された。

*1 特許第５９４７４７０号 微生物の物質生産性を向上させる方法および該方法に用いるキット

tRNA, protein production, streptomyces

発表責任者：廣瀬　修一（shuichi.hirose@nagase.co.jp）

講演番号：3C26a08
講演日時：3 月 19 日 11:15～ C 校舎 26 会場

# MqsR を介した目的タンパク質のみを生産可能な発現系の構築

# The expression system producing only target protein mediated by MqsR

○釋 真緒[1]、井上 正順[2]、山口 良弘[1,3] ([1]阪市大院理、[2]ラトガース大、[3]阪市大複合先端研)
○Mao SHAKU[1], Masayori INOUYE[2], Yoshihiro YAMAGUCHI[1,3] ([1]Osaka City Univ., [2]Rutgers Univ., [3]OCARINA)

【目的】

大腸菌の MazE-MazF toxin-antitoxin system の MazF toxin は 1 本鎖 RNA の ACA 配列を特異的に切断するエンドリボヌクレアーゼである [1]。この性質を利用して、大腸菌内で目的タンパク質のみを発現可能な Single-Protein Production (SPP) system が確立された [2]。大腸菌のほとんどの遺伝子は ACA を含むため、SPP system では、目的タンパク質のアミノ酸配列を変えずに ACA を除くことで、MazF 発現下で目的タンパク質のみが合成される。SPP system は $^{13}C$ や $^{15}N$ などの安定同位体を用いて特定タンパク質のみを標識できることから、生細胞内でのタンパク質構造・機能解析への応用が期待されている。しかし、MazF を用いた SPP system では、長期間の単一タンパク質の安定発現や ACA 配列を持たない遺伝子産物の標識による高いバックグラウンド等の問題が生じている。そこで、我々はこれらの問題を解決するために、大腸菌の持つ toxin で GCH (H= A、C または U) 配列特異的に1 本鎖 RNA を分解する MqsR を用いた新規の SPP system の構築を試みた。

【方法および結果】

目的タンパク質として eotaxin (74 aa, 8.5 kDa) および calmodulin (149 aa, 16.8 kDa) を用いた。アミノ酸配列を変えずにそれぞれの遺伝子から GCH 配列を除いた遺伝子を合成し実験に使用した。MqsR および目的タンパク質の発現ベクターには IPTG 誘導性プロモーターを持つ pACYC および pCold ベクターをそれぞれ用いた。MqsR および目的タンパク質の発現ベクターを有する大腸菌 BL21(DE3) を培養し、IPTG 添加後にパルスラベルを行った。その結果、eotaxin と MqsR を共発現させると誘導 96 時間後まで eotaxin のみ発現した。よって、MazF と同様に MqsR を用いた SPP system が可能であることが証明された。さらに、MazF を用いた SPP system では、誘導 96 時間後には eotaxin 以外のタンパク質発現が見られたが、MqsR では 96 時間後でも目的タンパク質のみが発現していた。一方で、calmodulin と MqsR の共発現では細胞内のタンパク質合成は阻害されたが、calmodulin の発現は確認できなかった。現在、MqsR を用いた SPP で発現させたタンパク質の安定同位体の取り込み効率を解析中である。

1. Zhang Y., *et. al.* 2003 Mol Cell. 12 (4) 913-923

2. Suzuki M., *et al.* 2005 Mol Cell. 18 (2) 253-261

SPP system, NMR, *E.coli*

講演番号：3C26a09
講演日時：3 月 19 日 11:30～ C 校舎 26 会場

# Advanced technology of recombinant protein expression through LEA peptide co-expression system

○Nishit Pathak, Shinya Ikeno (Kyutech)

The currently understanding is that production of recombinant proteins is a key technology in various fields of research and development. A rapid and efficient effect to approaching for expressing the recombinant protein in *Escherichia coli* (*E. coli*) have been developed through co-expression system of LEA peptide based on the number of repeats of an 11-amino acid motif of Group3 LEA proteins originating from *P. vanderplanki* larvae. In *E. coli,* we expressed the GFP as a target protein to advance our LEA peptide co-expression system. We introduced mutation in our original LEA I peptide sequence and replaced the glycine at 6th and 12th position with other amino acids for the development of novel LEA peptide sequence in the co-expression system. The expression of LEA peptide was done by induction of 0.1mM IPTG and demonstrated through fluorescence meter and SDS-PAGE analysis. The expression yields increased twofold as a comparison to GFP after induction IPTG.

The protein expression of mutated LEA peptides (LEA-E, LEA-K, and LEA-N) were increased with the culture time as compared with co-expression of LEA-I. But the protein expression with LEA-S peptide was decreased to compare with co-expression of LEA-I. In increasing the protein expression by the co-expression, LEA peptides positively and negatively charged amino acids play a vital role. According to our hypothesis, the constructed mutated LEA peptide protects the target protein from the activity of lysozyme in the cell. The mutated LEA peptide patterns resulted in changes in, hydropathy and the Pi value. Target protein expression in *E. coli* increases without affected growth responses. These results confirmed that the complete motif repeat structures and an appropriate hydrophilic/hydrophobic nature and size balance are important for the LEA peptide in express the target protein through our co-expression system.

LEA, peptide, co-expression

発表責任者：池野慎也（ikeno@life.kyutech.ac.jp）

講演番号：3C26a10
講演日時：3 月 19 日 11:45～ C 校舎 26 会場

帰納法による可溶性発現技術の開発
Development of soluble expression techniques by inductive method
○松井 大亮[1,2]、浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大工・生工研セ、[2]JST, ERATO)
○Daisuke MATSUI[1,2], Yasuhisa Asano[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]ERATO, JST)

**【目的】**異種発現系で酵素遺伝子を発現させた場合、封入体の形成で活性を示さないことが多く、この点が異種宿主による酵素の発現において問題となっている。われわれは、大腸菌で封入体を形成する植物キャッサバ由来ヒドロキシニトリルリアーゼや海洋性細菌 *Marinomonas mediterranea* 由来 L-リジンε-酸化酵素を、アミノ酸置換により活性を持つ酵素として発現することに成功している。これらの結果を踏まえて、他の封入体形成酵素のランダム変異酵素ライブラリーから可溶化する酵素を見出し、可溶性発現の共通性を調査した。
**【結果】**変異導入による可溶性酵素の単離：節足動物由来マンデロニトリル酸化酵素 (*Chua*MOX) やシロイヌナズナ、キイロショウジョウバエ由来アミノ酸代謝関連酵素など大腸菌で封入体を形成するタンパク質に変異を導入し、それらの可溶性発現を検討した。*Chua*MOX では、Val455 が Ala や Glu、Gln、Asp、Asn に置換されて活性を持つ酵素として発現していることを見出した。野生型酵素と変異型酵素 V455E の封入体をグアニジン溶液で可溶化した後に、還元剤と補酵素を含む緩衝液に滴下し、経時的に活性を測定することでリフォールディングのタイムコースを測定した。その結果、変異型酵素の方が、リフォールディング効率が高く、上記の変異はフォールディングに影響していると推定された。また、シロイヌナズナ由来 L-アルギニン脱炭酸酵素 (*At*ADC) では、Arg430 が Leu や Ala、Val に置換されることで、活性を示すことを明らかにした。
二次構造に着目した可溶性発現：上記の *Chua*MOX 変異体を二次構造予測法で解析した結果、Val455 は、α-ヘリックス構造に存在しており、ヘリカルホイールの図を描いた結果、親水性領域に存在する疎水性アミノ酸残基であった。*At*ADC Arg430 も同様にα-ヘリックス構造のアミノ酸配列中に存在しており、Arg430 は疎水性領域に存在する親水性アミノ酸残基であることが明らかとなった。「**α-ヘリックス構造部分の親水性領域に存在する疎水性アミノ酸残基を親水性アミノ酸、または同部分の疎水性領域に存在する親水性アミノ酸残基を疎水性アミノ酸に変異を導入**」することで活性を持つ可溶性酵素として発現できる可能性があると考え、他の不溶性発現酵素の二次構造を予測し、α-ヘリックス構造の、「疎水性領域に存在する親水性アミノ酸残基」もしくは、「親水性領域に存在する疎水性アミノ酸残基」を特定し、変異導入により活性型酵素を探索した。その結果、キイロショウジョウバエ由来 D-アミノ酸酸化酵素、L-オルニチン脱炭酸酵素、および L-グルタミン酸脱水素酵素を活性型酵素として発現させることに成功した。

heterologous expression, mutagenesis, secondary structure

発表責任者：浅野　泰久（asano@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：3C26p01
講演日時：3 月 19 日 14:00～ C 校舎 26 会場

枯草菌を宿主とした L-gluconate 生産系の開発
Production of L-gluconate in *B. subtilis*
○久住 夏紀[1]、清水 哲[1]、吉田 健一[2]、中村 顕[1] ([1]筑波大・生命環境、[2]神戸大・科技イノベ)
○Natsuki Kusumi[1], Tetsu Shimizu[1], Ken-ichi Yoshida[2], Akira Nakamura[1] ([1]Tsukuba Univ., [2]Kobe Univ.)

【目的】日本などの先進国では、成人病対策やダイエット志向の高まりにより、アスパルテーム等の低カロリー合成甘味料が多く利用されているが、これらは糖類ではなく砂糖とは異なる独特な甘味を呈するため、万人には受け入れられていないのが現状である。ヒトは D-glucose を代謝することができるが、その立体異性体である L-glucose は代謝することができない。そのため、自然な甘味を呈する L-glucose を代替甘味料として利用することが期待されているが、L-glucose は天然には存在しておらず、現在までに報告されている化学合成方法では高価なため、実用化には至っていない。

我々が明らかにした *Paracoccus laeviglucosivorans* の L-glucose 代謝経路では、L-glucose は LgdA により L-gluconate へ、さらに LgnH により 5-keto-L-gluconate へと変換されて代謝される。また近年報告された超好熱菌 *Thermotoga maritima* (*Tma*)の新たな inositol 代謝経路では、*myo*-inositol が一般的な IolG により inosose へと変換された後、同経路に特異的な IolM (inosose dehydrogenase), IolN (diketo-inositol hydratase)により 5-keto-L-gluconate へと変換され、さらに代謝されていく。そこで、枯草菌 inositol 代謝経路の IolG 及び上記の IolM, IolN、そして LgnH の逆反応を組み合わせることにより、自然界に豊富に存在し安価な inositol から 5-keto-L-gluconate を経由して L-gluconate を生産する系を、枯草菌を宿主として構築することを当面の目的とし、最終的には L-glucose 生産系の開発を目指す。

【方法及び結果】*Tma*IolMN は超好熱菌由来の酵素であるため、枯草菌での利用には適していない。そこで他の好熱菌・中温菌由来の IolMN オルソログについて酵素活性を検討し *Desulfotomaculum nigrificans* (*Dni*) IolM および *Aneaerobaculum hydrogeniformans* (*Ahy*) IolN を枯草菌へ導入する遺伝子として選抜した。*DniiolM* および *AhyiolN*、さらに *lgnH* を枯草菌高発現ベクターpHT255 にクローニングし、枯草菌での発現を試みたところ、Western blot の結果から *DniiolM* と *AhyiolN* の発現を検出することができた。また、*DniiolM* および *lgnH* を発現させた枯草菌の無細胞抽出液と各々の基質を一晩 incubate した反応産物を HPLC 分析した結果、これらの酵素は枯草菌内で活性を持った状態で生産されていることが示唆された。また、inositol を含む培地で *DniiolM* を発現させた枯草菌を培養した結果、inositol から diketo-inositol が生産されることを確認した。次いで、これら 3 つの酵素の発現量を増大させるため、枯草菌 codon usage に最適化した合成遺伝子を作製し、枯草菌内で発現を試みたが、native 遺伝子よりも高い発現量を得ることはできなかった。今後はこれらの遺伝子を枯草菌内で同時発現させる系を構築する予定である。

*Bacillus subtilis*, L-gluconate, L-glucose

発表責任者：久住夏紀（s1530215@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3C26p02
講演日時：3 月 19 日 14:15～ C 校舎 26 会場

グルクロン酸とフルクトースからなるオリゴ糖の酵素合成
Enzymatic synthesis of oligosaccharide consisting of fructose and glucuronic acid
○保坂 浩貴[1]、徳田 亜佐美[1]、平野 貴子[2]、袴田 航[1,2]、田代 充[3]、西尾 俊幸[1,2] ([1]日大院生資科、[2]日大生資科、[3]明星大理工・総合理工)
○ Hiroki HOSAKA[1], Asami TOKUDA[1], Takako HIRANO[2], Wataru HAKAMATA[1,2], Mituru TASHIRO[3], Toshiyuki NISHIO[1,2] ([1]Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [2]Nihon Univ., [3]Meisei Univ.)

【目的】当研究室ではスクロース類似構造を有するオリゴ糖の研究を進めている。その中でも、*N*-グルコサミン(GlcNAc)、グルクロン酸(GlcUA)、およびグルクロン酸アミド(GlcUAm)に注目し、これらの単糖を有するスクロース類似糖の合成を検討している。以前に、GlcNAc とスクロースの混合糖溶液に糖転移型 β-フルクトフラノシダーゼを含む *Aspergillus oryzae* の乾燥菌糸を作用させることで *N*-アセチルスクロサミン(SucNAc)の効率の良い合成に成功している。この、SucNAc はプレバイオティクスとしての評価が行われている。本研究では、グルクロン酸を含むスクロース類似構造糖の合成を試みた。
【方法・結果】グルクロン酸とスクロースの混合糖溶液に *Arthrobacter* sp.K-1 株由来の β-フルクトフラノシダーゼを添加し反応を試みたが、TLC 上では糖転移生成物は確認できなかった。我々は、この原因がグルクロン酸のカルボキシル基による影響であると考えた。そのため、グルクロン酸のカルボキシル基をメチルエステル化したグルクロン酸メチルエステルを基質として用い、目的オリゴ糖の合成を試みた。また、このグルクロン酸メチルエステルはグルクロノラクトンからメタノール中で強塩基性陰イオン交換樹脂を用いることにより、高い収率で生成できることが本実験で確認できた。グルクロン酸メチルエステルとスクロースの混合糖溶液に上記の酵素を添加し反応させることにより、TLC 上で糖転移生成物と思われるスポットが確認できたため、これを活性炭カラムクロマトグラフィーにより精製し構造解析を行ったところ、スクロン酸メチルエステルであることが確認できた。このスクロン酸メチルエステルのエステル結合を強塩基性陰イオン交換樹脂により加水分解すると同時に本樹脂へ吸着させた後、1 N NaOH により樹脂からの脱着を行った。この脱着物を含む水溶液を 6 N HCl により中和した後、活性炭カラムクロマトグラフィーにより脱塩処理を行い凍結乾燥して粉末を得た。得られた生成物の構造を確認した結果、スクロン酸であることが確認できた。
酸性(pH 1.5)溶液や熱に対するスクロン酸の安定性を、構造類似体であるスクロース及び SucNAc を比較したところ、スクロン酸はスクロースや SucNAc に比べ若干ではあるが酸や熱に耐性があることが確認できた。また、*Arthrobacter* sp. K-1 株由来や *Saccharomyces cerevisia*e 由来の β-フルクトフラノシダーゼをこれらのオリゴ糖に作用させたところ、*Arthrobacter* sp. K-1 株由来の酵素ではスクロースのみが完全に分解されたのに対し、*Saccharomyces cerevisiae* 由来の酵素では、スクロン酸も若干ではあるが分解されることが確認できた。

enzymatic synthesis, oligosaccharide, Glucuronic acid

発表責任者：西尾俊幸（nishio.toshiyuki@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3C26p03
講演日時：3 月 19 日 14:30～ C 校舎 26 会場

グルクロン酸アミドとフルクトースから成るオリゴ糖の酵素合成
Enzymatic synthesis of oligosaccharide consisting of fructose and glucuronic amide.
○溝口 早織[1]、平野 貴子[2]、袴田 航[1,2]、田代 充[3]、西尾 俊幸[1,2] ([1]日大院生資科、[2]日大生資科、[3]明星大理工)
○ Saori MIZOGUCHI[1], Takako HIRANO[2], Wataru HAKAMATA[1,2], Mitsuru TASHIRO[3], Toshiyuki NISHIO[1,2] ([1]Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [2]Nihon Univ., [3]Meisei Univ.)

【目的】*N*-アセチルグルコサミンとスクロースの高濃度溶液に糖転移型の β-フルクトフラノシダーゼを含む *Aspergillus oryzae* の乾燥菌糸を作用させることで、スクロース類似構造を有する *N*-アセチルスクロサミンの量産に成功した。我々は、この他にもスクロース類似構造を有する様々なオリゴ糖の合成を検討している。そのなかで、我々は肝臓機能を改善し、医薬品として使われているグルクロン酸やグルクロン酸アミドといった単糖に注目した。本研究ではグルクロン酸アミドを含むスクロース構造類似糖の合成を試みた。
【方法・結果】グルクロノラクトンを含むエタノール溶液に 2 M アンモニア/エタノールを加えて反応させたところ、グルクロン酸アミドを収率よく合成することができた。続いて、スクロースとグルクロン酸アミドの高濃度溶液に *Arthrobacter* sp. K-1 株由来の β-フルクトフラノシダーゼを作用させたところ、糖転移反応生成物が TLC により確認された。しかし、グルクロン酸アミドにスクロースからフルクトース残基が転移するときに遊離するグルコースにより、*Arthrobacter* sp. K-1 株由来の β-フルクトフラノシダーゼが阻害されるため反応が途中で停止した。そこで、グルコースは資化するがスクロースは資化しない酵母(*Saccharomyces bisporus*)を添加し、反応系からグルコースを除去しながら反応を進めることを検討したところ、反応を効率よく進めることができた。目的の糖転移生成物を活性炭カラムクロマトグラフィーと中圧カラムクロマトグラフィーにより精製して構造を確認したところ、合成した生成物はスクロン酸アミドであることがわかった。
　次に、合成したスクロン酸アミドについて、構造類似体であるスクロース及び *N*-アセチルスクロサミンと諸性質を比較した。pH 1.5 条件下で各オリゴ糖の分解性を確認したところ、37, 50℃では分解性にあまり差が見られなかった。しかし、70℃ではスクロースと *N*-アセチルスクロサミンはほぼ完全に分解したが、スクロン酸アミドはある程度残存していた。このことから、スクロン酸アミドの酸・熱に対する安定性はスクロースと *N*-アセチルスクロサミンより若干高いことがわかった。続いて、微生物由来の β-フルクトフラノシダーゼを各オリゴ糖に作用させたところ、*N*-アセチルスクロサミンは分解されなかったが、スクロースとスクロン酸アミドは酵素で同程度の速度で速やかに分解されたことが確認できた。

Enzymatic synthesis, Oligosaccharide, Glucuronic amide

発表責任者：西尾 俊幸（nishio.toshiyuki@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3C26p04
講演日時：3 月 19 日 14:45～ C 校舎 26 会場

# グリコシダーゼの糖転移作用を利用した新規オリゴ糖の合成及びプレバイオティクスとしての評価
# Synthesis of novel oligosaccarides using transglycosylation activity of glycosidases, and evalution of them as prebiotics

○坂木 洋平[1]、西垣 あずさ[2]、松井 彩香[2]、荒川 浩輔[2]、平野 貴子[2]、袴田 航[1,2]、田代 充[3]、西尾 俊幸[1,2] ([1]日大院生資科、[2]日大生資科、[3]明星大理工)
○Yohei SAKAKI[1], Azusa NISHIGAKI[2], Ayaka MATSUI[2], Kosuke ARAKAWA[2], Takako HIRANO[2], Wataru HAKAMATA[1,2], Mitsuru TASHIRO[3], Toshiyuki NISHIO[1,2] ([1]Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [2]Nihon Univ., [3]Meisei Univ.)

【目的】ラクト-*N*-ビオースや *N*-アセチルラクトサミンのような *N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を構成糖として含むヘテロオリゴ糖には、病原菌に対する腸管接着阻害効果やビフィズス菌増殖促進効果などがあることが報告されている。このことから GlcNAc 含有ヘテロオリゴ糖には様々な有用な生理機能が期待できる。以前に、当研究室では GlcNAc と Sucrose(Suc)の高濃度溶液に糖転移型 β-フルクトフラノシダーゼを含むコウジキンの乾燥菌糸を全細胞触媒として作用させることで、Suc の Glucose 残基が GlcNAc に置き換わった *N*-アセチルスクロサミン(SucNAc)の合成に成功した。SucNAc は Suc よりも酸性溶液中で安定であり、様々の Suc 加水分解酵素では分解されにくいことが分かっている。また、SucNAc を原料として、糖転移型 β-フルクトフラノシダーゼを含むコウジキンの乾燥菌糸を全細胞触媒として作用させることで、1-Kestose の構造類似体である *N*-アセチル-1-ケストサミン(1-KesNAc)の合成にも成功している。さらに、SucNAc と Melibiose を基質として α-ガラクトシダーゼを作用し糖転移反応させ、Raffinose の構造類似体である *N*-アセチルラフィノサミン(RafNAc)の合成にも成功している。本研究では、SucNAc と Lactose(Lac)を基質として β-ガラクトシダーゼを作用し糖転移反応させ、Lactosucrose の構造類似体の酵素合成を行うことを目的とし、また合成した 3 種類のオリゴ糖の諸性質とプレバイオティクスとしての有効性を調査した。
【方法】【結果】SucNAc と Lac の高濃度溶液中に、コウジキン由来の β-ガラクトシダーゼを作用させ、得られた生成物を HPLC により分析したところ、2 種類の生成物が確認できた。そこで、それぞれを分離し、NMR と MS により構造を確認したところ、SucNAc の GlcNAc 残基に Gal が β-1,6 結合した Product 1 と SucNAc の Fructose(Fru)残基に Gal が β-1,6 結合した Product 2 であることが明らかとなった。続いて、今までに合成した 1-KesNAc、RafNAc 及び今回メインとして合成できた Product 1 の諸性質調査を行った。各オリゴ糖の酸・熱安定性は、pH 1.5、37℃, 80℃で 1 時間インキュベートした後、TLC によりその分解の程度を調べた。その結果、1-KesNAc は 37℃でわずかに SucNAc と Fru に分解が確認でき、80℃では GlcNAc と Fru にまで分解された。一方、RafNAc と Product 1 は 37℃では分解が確認できなかったが、80℃ではどちらも Gal-GlcNAc と Fru に分解された。また、腸内細菌による各オリゴ糖の資化性を調べるため、Bifidobacterium 属と Lactobacillus 属の細菌を GAM 培地で培養後、生理食塩水で洗浄し、前培養液由来のグルコースを除去した後、各オリゴ糖含有培地に添加し培養した。菌の増殖は $OD_{600}$ における菌体濁度を測定して調べた。また糖の分析は、TLC と TLC から糖の定量を行う Gel Documentation system を用いて調べた。その結果、今回用いた Bifidobacterium 属と Lactobacillus 属の細菌共に RafNAc、Product 1 に対する資化性は低かった。しかし、1-KesNAc は今回用いた菌株をほとんど資化した。このことから腸内細菌の糖質資化に関しては、1-KesNAc は RafNAc と Product 1 とは異なる様式であることが示唆された。

glycosidase, transgalactosylation, novel oligosaccarides

発表責任者：西尾俊幸（nishio.toshiyuki@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3C26p05
講演日時：3 月 19 日 15:00～ C 校舎 26 会場

# キチンオリゴ糖を原料とした新規 GlcNAc 含有ヘテロオリゴ糖の酵素合成

# Enzymatic synthesis of novel hetero-oligosaccharides using chitin oligosaccharides as a raw materials

○上原 旭輝[1]、森山 芽衣[2]、平野 貴子[2]、袴田 航[1,2]、西尾 俊幸[1,2]([1]日大院生資科、[2]日大生資科)
○Asaki UEHARA[1], Mei MORIYAMA[2], Takako HIRANO[2], Wataru HAKAMATA[1,2], Toshiyuki NISHIO[1,2] ([1]Graduate School of Bioresources, Nihon Univ., [2]Nihon Univ.)

【目的】キチンは *N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)が β-1,4 結合で直鎖状に連なった多糖であり、地球上でセルロースに次いで多く存在するバイオマスである。GlcNAc が重合した特定鎖長のキチンオリゴ糖や GlcNAc を含むヘテロオリゴ糖は、様々な有用生理機能特性を有することが報告されている。そこで当研究室では、GlcNAc を構成糖として含む機能性オリゴ糖の酵素利用生産と機能性評価に関する研究を行なってきた。現在までに、糖転移型の β-*N*-アセチルヘキソサミニダーゼを含む *Stenotrophomonas maltophilia* 乾燥菌体を用いた中鎖キチンオリゴ糖の効率の良い合成法を確立した。また、GlcNAc にフルクトースが結合したスクロース類似構造糖である *N*-アセチルスクロサミン(SucNAc)の酵素法による量産化に成功している。そこで、本研究ではキチンオリゴ糖にフルクトースが結合したタイプの新規な GlcNAc 含有オリゴ糖の酵素合成を試みた。
【方法・結果】$(GlcNAc)_2$ とスクロースの高濃度溶液中に糖転移型 β-フルクトフラノシダーゼを作用させ、$(GlcNAc)_2$ の還元末端側へフルクトースの転移を試みた。しかし、反応生成物を TLC で分析した結果、転移生成物と思われるスポットは確認できなかった。そこで SucNAc を基質として用い、SucNAc 中の GlcNAc 残基の４位へ GlcNAc を β-アノマーで結合させることを試みることにした。$(GlcNAc)_2$ と SucNAc の高濃度溶液中に糖転移型の β-*N*-アセチルヘキソサミニダーゼを含む *Stenotrophomonas maltophilia* 乾燥菌体を全細胞触媒として作用させた。反応生成物を TLC で分析した結果、転移生成物と思われるスポットが確認できた。また、HPLC により分析した結果、基質である SucNAc と $(GlcNAc)_2$ が減少するにつれ、転移生成物が増加していた。そこで、反応生成物を活性炭カラムクロマトグラフィーにより精製後、凍結乾燥を行い転移生成物を粉末として得た。精製した転移生成物は、酵素法および NMR 分析により構造解析を行った。転移生成物に *Streptomyces plicatas* 由来の β-*N*-アセチルヘキソサミニダーゼあるいは *Aspergillus oryzae* 由来の β-フルクトフラノシダーゼを添加し、それぞれの分解物を TLC および NMR により分析した。その結果、転移生成物が $(GlcNAc)_2$ の還元性末端残基の１位にフルクトースが結合した構造を有していることが示唆された。

Transglycosylation, ß-N-Acetylhexosaminidase, Chitin oligosaccharides

発表責任者：西尾俊幸（nishio.toshiyuki@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3C26p06
講演日時：3 月 19 日 15:25～ C 校舎 26 会場

# 廃グリセリンからのエリスリトール変換における培養条件の検討

# Culture condition of erythritol production using glycerol waste as a carbon source

○安彦 良祐[1]、岩田 悠志[1]、村上 紀里子[3]、東田 英毅[3]、渡邉 泰祐[1,2]、荻原 淳[1,2]、春見 隆文[1,2] ([1]日大生資科・生命化、[2]日大院生資研究科・生資利用、[3]株式会社ちとせ研究所)
○ Ryousuke ABIKO[1], Hisashi IWATA[1], Kiriko MURAKAMI[3], Hideki TOUDA[3], Taisuke WATANABE[1,2], Jun OGIHARA[1,2], Takafumi KASUMI[1,2] ([1]Dept.Chem.Life.Sci., Nihon Univ., [2]Dept.Biores.Util.Grad.Sch.Biores.Sci., Nihon Univ., [3]Chitose Laboratory Corp.)

＜目的＞低カロリー甘味料として食品等に利用されているエリスリトールは、近年、化成品の原料としても注目されている。しかし、食品用途と同じ製造方法ではコスト的な問題から、化成品の原料としては成り立たない。そこで演者らは、廃グリセリンを炭素源に、発酵法による安価な生産を検討している。これまでに、*Moniliella megachiliensis* が廃グリセリンを資化してエリスリトールを生産することを予備的試験により見出しているが、本検討では三角フラスコ、1 L 及び 10 L ジャーファーメンターを用いて、より詳細な培養条件及び生成収率の向上について試験した。
＜方法＞炭素源として、廃グリセリンの代わりに品質が均一な精製グリセリンを用いた。三角フラスコスケールにおいてグリセリン濃度（10–50%）、窒素源（酵母エキス）濃度、初発 pH、初発菌体密度、培養温度等について検討し、エリスリトール高生産条件を決定した。この三角フラスコでの培養条件をもとに、1 L ジャーファーメンターによる培養試験、さらに 10 L ジャーファーメンターによるスケールアップ試験を行い、スケールアップに伴う収率及び再現性について検討した。
＜結果＞三角フラスコスケールではグリセリン濃度が 20%及び 30%のときにエリスリトール生産量が高く、40%以上では生産量が低下した。窒素源濃度は 20%グリセリンのとき 1%、30%グリセリンのとき 2%が、エリスリトール収量に好結果をもたらした。一方、初発 pH は、エリスリトール生産量にほとんど影響を与えなかった。また、本培養時の初発菌体密度は $1 \times 10^6$ 個/mL 程度、培養温度は 36℃が最適であった。これらの結果をもとに 1 L 及び 10 L ジャーファーメンターでの培養試験を行った結果、スケールアップに伴う収量の向上と再現性が確認された。また、廃グリセリンを用いた同様な検討も行う予定である。

glycerol waste, erythritol, fermentation

講演番号：3C26p07
講演日時：3 月 19 日 15:40～ C 校舎 26 会場

アブラナ科植物植栽地における大気中微量硫黄化合物である硫化カルボニルの発生
Emission of carbonyl sulfide, an atmospheric sulfur gas, at the Brassica field
○正木 啓仁、関田 真奈、片山 葉子（農工大）
○Yoshihito MASAKI, Mana SEKITA, Yoko KATAYAMA (Tokyo University of Agriculture and Technology)

【背景と目的】
硫化カルボニル(以下 COS)は大気中に約 500 pptv の濃度で存在する大気微量硫黄ガスであり、地球の熱収支に影響する硫酸エアロゾルの主要な起源物質の一つである。COS の主な消失源は植物と土壌であり、COS 分解を行う土壌微生物も分離されている。このように土壌は一般に COS の消失源と考えられている。しかし含硫黄化合物のチオシアネート（以下 SCN）を土壌に添加することによって COS の放出がみられることから、SCN が供給される土壌では COS 分解を上回る COS 生成が予想される。しかしながら、SCN 配糖体(グルコシノレート)からの COS 生成を調べた研究は少ない。そこで、本研究ではグルコシノレートを組織内に高濃度に含むアブラナ科植物の植栽地において、周辺の大気を高さ別に採取する事で COS の発生が見られるかどうかを調べた。さらに COS 発生の要因を明らかにするために、植物体および土壌からの COS 発生量を評価すると共に、グルコシノレートから COS を発生する細菌の分離も試みた。
【方法】
アブラナ科植栽地としてナノハナ、ノラボウ、またはコマツナを栽培している農地の COS 鉛直濃度分布を、捕集した気体を液体酸素下で濃縮後、FPD-GC によって測定した。COS 発生の要因を明らかにするため、気体捕集用 5L アルミバッグ内に植物体または土壌を入れ、気相中の COS 濃度の変化を経時的に測定した。アブラナ科植物のブロッコリーから抽出したグルコシノレートを土壌に添加することで、土壌微生物による COS の発生を評価した。グルコシノレートを唯一の炭素源とする培地に土壌希釈液を塗抹し、グルコシノレート分解細菌を分離した。
【結果】
アブラナ科植物植栽地では地表面に近い程 COS 濃度が上昇した。これは、アブラナ科植物以外の植栽地で観測された COS の鉛直分布とは全く逆の分布であった。アブラナ科植物植栽地の土壌は、グルコシノレートの添加(シニグリン換算で 22 nmol)により 5L アルミバッグ内に 2 nmol の COS を放出した。この土壌よりグルコシノレートを分解して COS を発生する細菌 *Rhizobium alamii* THI601 株を分離した。さらにノラボウを葉、茎、根にわけたところ、特に根から多量の COS(100 nmol/g dry weight)が放出した。以上の結果、植物体および土壌微生物が COS を放出し、地表面付近の大気 COS 濃度を上昇させることが示された。

Sulfur, Carbonyl sulfide, Glucosinolate

発表責任者：片山葉子（katayama@cc.tuat.ac.jp）

講演番号：3C26p08
講演日時：3 月 19 日 15:55～ C 校舎 26 会場

海洋性硫黄酸化細菌の COS 分解特性
COS degradation by marine sulfur-oxidizing bacteria
○猪原 英之[1]、堀 知行[2]、青柳 智[2]、高崎 みつる[3]、片山 葉子[1]([1]東京農工大院農、[2]産総研・環境管理、[3]石巻専修大理工)
○Hideyuki Ihara[1], Tomoyuki Hori[2], Tomo Aoyagi[2], Mitsuru Takasaki[3], Yoko Katayama[1] ([1]Tokyo Univ. of Agriculture and Technology, [2]AIST EMRI, [3]Ishinomaki Senshu Univ.)

【背景】
硫化カルボニル（以下 COS）は大気微量成分の 1 種であり、対流圏において最も豊富に存在する気体状硫黄化合物である。海洋では COS はジメチルサルファイドや二硫化炭素の光分解などにより生成され、海洋は COS の放出源の一つとなっている。加えて、熱水噴出孔から放出される気体にも COS が含まれる場合があり、海洋においても硫黄循環に COS が関与している。これまでに本研究室が行ってきた研究により、土壌には COS を分解する細菌が広く生育することが明らかになってきている。しかし、海洋性細菌の COS 分解活性についての知見は少なく、海洋での COS の動態に対して微生物が果たす役割は不明である。そこで本研究では、津波によって陸上に打ち上げられた海洋堆積物から分離された海洋性硫黄酸化細菌を用い、その COS 分解活性を調べることを目的とした。
【方法】
東日本大震災によって打ち上げられた海洋堆積物から、限界希釈法により分離した 4 株の硫黄酸化細菌（TSL1, TSL2, TSL3, TSL6 株）を供試した。TSL1 株及び TSL6 株は Epsilonproteobacteria 綱の *Sulfurovum aggregans* に近縁であったが、16S rRNA 遺伝子の相同性は低く（それぞれ 97, 96%）、新種である可能性がある。一方、TSL2 株及び TSL3 株は Gammaproteobacteria 綱の *Thiomicrospira crunogena* に近縁であり 16S rRNA 遺伝子の相同性は高かった（99%）。COS 分解活性を調べる際には、チオ硫酸塩を含む無機塩培地にこれらの菌を接種し、30 ppmv となるように COS を気相に添加して 24 時間、30℃で培養を行った。その間の COS 濃度の変化を FPD-GC を用いて経時的に測定し、細菌非添加の系との COS 濃度の差から細菌株の COS の分解活性を求めた。
【結果】
分離された 4 菌株ではいずれも COS 濃度は低下した。培養 24 時間後の COS 濃度は TSL1 株と TSL6 株ではそれぞれ 29%、34%、TSL2 株と TSL3 株ではそれぞれ 92%、89%の減少量であった。この結果、海洋堆積物から分離された 4 菌株は COS を分解する能力を有することが示された。これら 4 菌株の生育条件に伴う COS 分解活性、並びに生理生化学的な諸性質についても報告する。

carbonyl sulfide, sulfur-oxidizing bacteria, marine sediment

発表責任者：猪原　英之（ihara.fuji@gmail.com）

講演番号：3C26p09
講演日時：3 月 19 日 16:10～ C 校舎 26 会場

*Thiobacillus thioparus* THI115 の硫化カルボニル加水分解酵素の基質認識機構の解明
Substrate recognition mechanism of carbonyl sulfide hydrolase from *Thiobacillus thioparus* THI115

○小川 貴弘[1]、野口 恵一[1]、尾高 雅文[2]、養王田 正文[1]、片山 葉子[1] ([1]東農工大院、[2]秋田大院・理工)
○ Takahiro OGAWA[1], Keiichi NOGUCHI[1], Masafumi ODAKA[2], Masafumi YOHDA[1], Yoko KATAYAMA[1] ([1]Tokyo Univ. of Agric. and Technol., [2]Akita Univ.)

【背景・目的】硫化カルボニル (COS) は対流圏におよそ 500 pptv で存在する気体状硫黄化合物である。その一部は成層圏へ移行し硫酸イオンへ分解され、気候変動やオゾン層の破壊に影響を及ぼす成層圏硫酸エアロゾルの凝結核として働く。そのため、主要な起源物質である COS の動態を把握することは重要である。COS の主要な消失源は植物及び土壌であることが知られ、我々は様々な土壌微生物に COS 分解活性があることを明らかにしてきた[1]。

硫黄酸化細菌 *Thiobacillus thioparus* THI115 はエネルギー源としてチオシアネートで生育させた時、thiocyanate hydrolase によって COS を生成し、さらに COS は COS hydrolase (COSase) によって分解される。COSase の酵素化学的な性質や結晶構造を明らかにしたところ、アミノ酸配列や結晶構造は二酸化炭素を可逆的に水和する β-carbonic anhydrase (β-CA) や $CS_2$ hydrolase と高い相同性があった[2]。一方、COSase の二酸化炭素水和活性や $CS_2$ 加水分解活性はわずかに見られた。これらの酵素の活性中心や推定される基質及び生成物の経路を比較したところ、COSase に特徴的なアミノ酸や構造が見られたのでこれらのアミノ酸変異体を作製し、基質特異性のメカニズムの解明を試みた。

【方法と結果】以下の 7 つの変異体を精製し、COS 加水分解活性を比較した。

① β-CA の結晶構造との比較から基質結合部位近傍で触媒サイクルや基質認識に関わることが示唆されるアミノ酸を β-CA で見られるアミノ酸やサイズの小さいグリシンに変異させた変異体 (H63F、M45A、I82Y、L87G)
② COSase に特徴的な推定上の基質及び生成物の経路を狭めている α5 ヘリックスを欠損させた欠損変異体
③ $CS_2$ hydrolase の結晶構造との比較から COSase の推定上の基質及び生成物の経路を疎水性にしているアミノ酸を $CS_2$ hydrolase で見られるアミノ酸へ変異させた変異体 (I33R、A47E)

I82Y の COS 加水分解活性は消失し、I82 は基質認識に大きく寄与していることが示唆された。一方、H63F は wild type ほどではないが活性を保持した。5 つの変異体は不溶性となったため、chaperone プラスミドと共発現させたところ、収量は少ないものの可溶化が確認された。現在、これらの変異体の精製を行なっている。

1) T. Ogawa *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **363**, fnw223 (2016).
2) T. Ogawa *et al.*, J. Am. Chem. Soc., **135**, 3818-3825 (2013).

carbonyl sulfide, COS hydrolase, Thiobacillus thioparus

発表責任者：小川貴弘（togawa@cc.tuat.ac.jp）

講演番号：3C26p10
講演日時：3 月 19 日 16:25～ C 校舎 26 会場

# 微生物による金属鉄腐食プロセスの解析

# Studies on the process of iron corrosion by bacteria

○井上 達也[1]、平野 伸一[2]、松本 伯夫[2]、新井 博之[1]、石井 正治[1] ([1]東大　農生科、[2]電中研)
○Tatsuya Inoue[1], Shin-ichi Hirano[2], Norio Matshumoto[2], Hiroyuki Arai[1], Masaharu Ishii[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]CRIEPI)

【背景及び目的】微生物によって金属腐食が促進される微生物腐食が報告されている。嫌気条件下、金属鉄の腐食は鉄表面で形成されたアノード側での鉄酸化溶解反応とカソード側でのプロトンの還元反応に担われている。微生物腐食では鉄由来の電子、もしくはカソード反応で生じた水素を電子供与体として利用する微生物の存在によりカソード反応が促進されると考えられている。近年、このような腐食を促進する微生物としてメタン菌・酢酸菌のような水素資化性独立栄養細菌が報告された。これら水素資化性独立栄養性細菌は腐食を引き起こす反面、金属鉄の持つエネルギーを利用して $CO_2$ をメタンや酢酸のような有用物質へと変換する能力を有しているため、能力を利用した新しい $CO_2$ からの有用物質生産プロセスを構築できる可能性がある。しかし、腐食性独立栄養細菌は報告事例が少なく、知見の拡充が必須である。そこで、本研究では炭素源として $CO_2$、電子供与体として金属鉄を用い、自然環境中や既知微生物から腐食性微生物の探索を行うと共に、腐食プロセスを明らかにすることを目的とした。これまでの研究において、嫌気条件下（$N_2$:$CO_2$=80:20）、鉄顆粒を添加した無機塩培地に湖沼底泥を微生物源として摂取し、30℃で 1 カ月培養し、金属鉄からの鉄溶出量および有機酸量を定量し、活性の高い試料について複数回の継代培養と平板培養を行うことで、金属鉄を腐食し、酢酸を生産しながら増殖する EE-1 株を単離している。EE-1 株は既知の *Desulfovibrio* 属に分類された。また、既存の水素資化性独立栄養細菌 5 種について、上記と同様の培養試験を行い、鉄腐食能の評価を行った。その結果、*Clostridium autoethanogenum, Clostridium carboxidivorans, Sporomusa ovata* の 3 種については顕著な鉄腐食能と酢酸生産が検出された。
【方法及び結果】先行研究によって、鉄腐食能は特殊な微生物に限定されるものではなく、既知の微生物種にも広く存在している可能性が考えられた。腐食プロセスを明らかにするべく、特に高い鉄腐食能を示した *C. carboxidivorans* に関してトランスクリプトーム解析を進めている。電子供与体を syngas(CO と $CO_2$ と $H_2$ を含むガス)とする培養条件と、鉄を電子供与体とする培養条件とを設定し、マイクロアレイによって比較した。本発表ではマイクロアレイ結果について詳細に報告する。

MIC, iron, transcriptome analysis

講演番号：3C26p11
講演日時：3 月 19 日 16:50～ C 校舎 26 会場

# コリネ型細菌を用いたロドコッカス属細胞由来 *btf* 遺伝子群によるベンゾトリフルオリドの脱フッ素化機構の解析

# Elucidation of defluorination pathway of benzotrifluoride by heterologous expression of the *Rhodococcus btf* genes in *Corynebacterium glutamicum*

○佐々野 晴花、矢野 憲一、岩井 伯隆、和地 正明（東工大・生命理工学院）
○Haruka SASANO, Ken-ichi YANO, Noritaka IWAI, Masaaki WACHI (Dept. Life Sci. Technol., Tokyo Tech.)

【背景・目的】フッ素化合物は耐熱性、耐酸性などの高い安定性や撥水性などの特性を持つため、医薬品や農薬、高分子化合物など様々な分野で用いられている。しかしながら、この安定性が原因となってフッ素化合物が環境中に残留するという問題が報告されている。そこで、生物機能を利用した解決を目指し、ベンゾトリフルオリド（BTF）を分解、脱フッ素化できる微生物 *Rhodococcus* 属細菌 065240 株が土壌より単離された。BTF の脱フッ素化には *btf* 遺伝子群によるジオキシゲナーゼ経路が関与していることが示唆されている。各 *btf* 遺伝子の破壊株を作製したところ、*Δbtf*A はほとんど BTF を分解せず、*Δbtf*B は分解能が 10 %程度にまで減少した。一方で、*Δbtf*C と *Δbtf*D は BTF 分解に影響を与えなかった。しかし、このとき、ジオキシゲナーゼ経路で予想される中間代謝物が検出されなかったことから、BTF 分解経路の全容を解明することができなかった。これは *Rhodococcus* 属細菌が複数の芳香族化合物分解系を有しているためである可能性が考えられた。そこで、本研究では、本来 BTF 分解能を持たない *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 に *btf* 遺伝子を導入することにより、BTF 分解経路の解明を試みた。
【方法・結果】*btfA*、*btfAB* をそれぞれ pECt に挿入し、*C. glutamicum* ATCC 13032 に導入した。BTF 分解試験では、前培養液を 1%植菌した液体 L 培地に、基質 BTF（終濃度 20 mM）、IPTG（終濃度 1 mM）を添加し、30℃で 24 時間培養した後、上清のフッ化物イオン濃度をイオン電極により測定した。その結果、*btfA* を発現させた株においてフッ化物イオンの上昇が見られ、*btfAB* を導入した株においてフッ化物イオンがさらに上昇する傾向が見られた。また、*btfA* を発現させた株の 24 h 上清から *cis*-1,2-dihydroxy-3-trifluoromethylcyclohexa-3,5-diene が、*btfAB* を発現させた株の 16 h 上清から 3-trifluoromethylcatechol が確認できた。これらは予想されていた中間代謝物であった。さらに、3-trifluoromethylcatechol は塩基性条件下で非酵素的に脱フッ素化され、2,3-dihydroxybenzoate が生成することを見出した。以上の結果から、BTF の脱フッ素化経路が示唆された。一方で、*btfAB* を誘導した株を静止期まで培養した後に弱酸性に pH を調整し、BTF を添加して培養を続けることで、脱フッ素化が抑制され、3-trifluoromethylcatechol が蓄積することが確認された。この結果をもとに、*btf* 遺伝子の含フッ素化合物生産への利用の可能性を検討している。

*Rhodococcus*, *Corynebacterium glutamicum*, biodegradation

発表責任者：和地正明（mwachi@bio.titech.ac.jp）

講演番号：3C26p12
講演日時：3 月 19 日 17:05～ C 校舎 26 会場

クルクミン代謝微生物の探索
Screening of microorganisms involved in curcumin metabolism
○石上 佳奈、橋本 義輝、ハサニナサブ アザム、熊野 匠人、小林 達彦（筑波大院 生命環境）
○ Kana ISHIGAMI, Yoshiteru HASHIMOTO, Azam HASSANINASAB, Takuto KUMANO, Michihiko KOBAYASHI (Grad. School of Life and Environ. Sci., Univ. of Tsukuba)

【目的】　クルクミンはウコンに含まれる黄色色素で、薬理作用を有するポリフェノールの一種である。クルクミンはジヒドロクルクミン(DHC)を経由してテトラヒドロクルクミン(THC)へ代謝される経路は知られているものの、その変換反応に関わる酵素は（微生物からヒトに至るすべての生物において）同定されていなかった状況の中、我々は、腸内微生物である大腸菌がクルクミンを DHC や THC へと代謝する経路をもつことを見いだし、この代謝に関わる酵素を NADPH-dependent curcumin/dihydrocurcumin reductase (CurA)と同定・命名した[1]。さらに、土壌中の微生物による代謝経路を解明することを目的として、様々な土壌サンプルからクルクミン代謝微生物のスクリーニングを行い、これまでに沖縄県の土壌から大腸菌とは異なるクルクミン代謝経路を持つ微生物を単離した。本研究では、さらに異なる代謝経路をもつ微生物を解析することを目的とした。

【方法と結果】　各所から土壌サンプルを採集し、クルクミンを単一炭素源とする最小培地に添加し、28℃で振盪培養を行った。培養液を新しい液体培地に 1%植菌し、同条件で繰り返し集積培養を行った。培養液をクルクミン最少寒天培地に塗布し、コロニーを単離した。得られた複数の微生物のクルクミン代謝活性を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により測定した。その結果、茨城県の土壌から単離した微生物（以下、本菌とする）が、DHC、THC、沖縄県の土壌から単離した微生物のクルクミン代謝産物とも異なるピークを示したことから、本菌は大腸菌とも沖縄県から単離した微生物とも異なるクルクミン代謝経路をもつと示唆された。本菌のクルクミン変換活性を高めるべく、培地組成、培養時間や添加化合物の種類などを変えることで、最終的に本菌の至適培養条件を確立した。本酵素の精製を試みるべく、現在、菌の大量調製を検討しているところである。

（1）***Proc. Natl. Acad. Sci. USA***, **108**, 6615-6620 (2011)

screening, microorganism, metabolism

講演番号：3C26p13
講演日時：3 月 19 日 17:20～ C 校舎 26 会場

ヘテロ三環式化合物を分解する微生物の探索
Screening of microorganisms degrading a hetero-tricyclic compound
○永久保 利紀、熊野 匠人、橋本 義輝、小林 達彦（筑波大院 生命環境）
○Toshiki NAGAKUBO, Takuto KUMANO, Yoshiteru HASHIMOTO, Michihiko KOBAYASHI (Grad. School of Life and Environ. Sci., Univ. of Tsukuba)

【背景・目的】
β-カルボリンは、生合成的にはトリプタミンに由来する化合物であり、これを基本骨格とする化合物の多くが顕著な生理活性を示すことが知られている。ハルマリンは、β-カルボリン骨格を有する比較的単純な構造のアルカロイドの一種であり、自然界に広く存在している。特に、*Peganum harmala* の根および種子に多く含まれており、モノアミンオキシダーゼの活性を阻害し向精神作用を示すことから、古くから幻覚剤の成分として用いられてきた。しかしながら、ハルマリンを含むβ-カルボリンアルカロイドの微生物による代謝経路は全く解明されていない。そこで、本研究では、ハルマリンを代謝する微生物を土壌からスクリーニングし、微生物の有するハルマリン代謝経路の解明および本代謝酵素の取得を目的とした。
【結果】
ハルマリンを単一炭素源または窒素源とする最少培地に土壌を接種し、28℃で数日間振盪培養した。その後、新しい培地への植継ぎを繰り返して集積培養を行い、同組成の寒天培地に植菌した。生育してきたコロニーをさらに植継ぎ、菌の単離を行った。次に、それぞれの菌を単独培養し、休止菌体および無細胞抽出液を用いた反応を行った。この内、4 株で基質の減少と反応産物の増加を確認できた。この 4 株の中で安定した酵素活性を示した 1 株を選抜し、大量培養を行った。超音波処理により無細胞抽出液を調製後、現在、各種クロマトグラフィーを用いて、ハルマリン分解酵素の精製を試みている。

β-Carboline, screening of microorganisms, metabolism

講演番号：3C26p14
講演日時：3 月 19 日 17:35～ C 校舎 26 会場

スチルベン化合物の微生物代謝
The micorobial degradation of stilben compounds
○熊野 匠人、瀧下 友理、橋本 義輝、小林 達彦（筑波大院 生命環境）
○Takuto Kumano, Yuri Takishita, Yoshiteru Hashimoto, Michihiko Kobayashi (Grad. School of Life and Environ. Sci., Univ. of Tsukuba)

【目的】
様々な化合物が植物によって合成されるが、それらは植物体の枯死等によりいずれ微生物によって分解、代謝されると考えられる。植物が合成する化合物の構造多様性から考えると、それらを分解する微生物にはユニークな代謝経路が数多く存在していると期待される。しかし、多くの天然物について、微生物による代謝経路は不明である。
今回我々は二つの芳香環を有するスチルベン化合物に着目した。植物はシキミ酸経路を経由して様々な芳香族化合物を合成し、その合成量は膨大であるため、その分解経路を解明することは重要である。
本研究では、そのようなスチルベン化合物代謝を担う微生物を自然界よりスクリーニングし新たな代謝経路を解明するとともに、代謝に関わる遺伝子・酵素を同定することを目的とした。
【方法・結果】
本研究ではまず、対象とするスチルベン化合物を単一炭素源とする液体培地を用いて、数回の植継ぎを行う集積培養によって、スチルベン化合物資化能をもつ複数の菌の単離に成功した。次に単離した菌株毎に代謝活性の比較を行った。その結果、最も強いスチルベン化合物分解活性を示した菌を 16SrRNA 配列により同定した。また同時に、LC/MS 分析により、スチルベン化合物の代謝産物と考えられる化合物について同定を行った。

microorganism, metabolism, stilben

講演番号：3C26p15
講演日時：3 月 19 日 17:50～ C 校舎 26 会場

# レスベラトロールをピセアタンノールに変換する微生物の探索

# Screening of microorganisms capable of converting resveratrol to piceatannol

伊巻 尚人[1]、○古屋 俊樹[1,2]、齋 政彦[3]、木野 邦器[1]（[1]早大理工・応化、[2]東理大理工・応生、[3]森永製菓（株））
Naoto Imaki[1], ○Toshiki Furuya[1,2], Masahiko Sai[3], Kuniki Kino[1] ([1]Waseda Univ., [2]Tokyo Univ. Sci., [3]Morinaga & CO., Ltd.)

【背景・目的】

レスベラトロールの水酸化物であるピセアタンノールは、抗酸化作用や抗癌作用等の多様な生理活性を示す有用なポリフェノールであり、機能性食品や医薬品、化粧品の原料として有望な化合物である。我々はこれまでに、*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株由来の二成分型フラビン依存性モノオキシゲナーゼ HpaBC を発現させた大腸菌細胞を用いて、レスベラトロールからピセアタンノールを合成可能なことを明らかにしている[1)]。また、当該酵素はピセアタンノールをさらに水酸化し、3,4,5,3',5'-ペンタヒドロキシ-*trans*-スチルベンに変換する活性も有することを見いだしている[2)]。レスベラトロール水酸化活性を有する酵素の存在から、我々は自然界にも当該活性を示す微生物が存在するのではないかと予想した。本研究では、自然界からレスベラトロールをピセアタンノールに変換する微生物を探索し、野生型微生物を利用したピセアタンノール生産について検討した。

【方法・結果】

一次スクリーニングとして、反応の基質であるレスベラトロール、レスベラトロールの部分構造に相当する化合物のフェノール、および HpaBC の生理基質である 4-ヒドロキシフェニル酢酸（4-HPA）をそれぞれ炭素源とした培地を用い、これらを分解、資化する微生物を集積した。二次スクリーニングでは、一次スクリーニングにおいて集積された候補株に対してレスベラトロールを基質とした菌体反応を行い、HPLC 分析によりピセアタンノール生成の有無を確認した。その結果、4-HPA を炭素源としたスクリーニング系においてピセアタンノール合成活性を示す微生物が 23 株取得された。この中でとくに高い活性を示した 2 株について 16S rRNA 遺伝子配列解析を行なった結果、一方はグラム陰性の *Ensifer* 属細菌、もう一方はグラム陽性の *Arthrobacter* 属細菌と同定された。現在、この 2 株について諸性質および培養条件、反応条件の検討を行い、ピセアタンノール生産の最適化条件を検討している。

本研究の一部は、JST の研究成果展開事業マッチングプランナープログラムとして実施した。

1) T. Furuya, K. Kino, Tetrahedron Lett., 55, 2853-2855 (2014).
2) T. Furuya, M. Sai, K. Kino, Biosci. Biotechnol. Biochem., 80, 193-198 (2016).

oxidation, piceatannol, resveratrol

発表責任者：木野邦器（kkino@waseda.jp）

講演番号：3C26p16
講演日時：3 月 19 日 18:05～ C 校舎 26 会場

# 6-ジンゲロールの微生物反応による配糖化に関する研究

Microbial production of α-glucosyl-6-gingerol by Ensifer sp. M-26

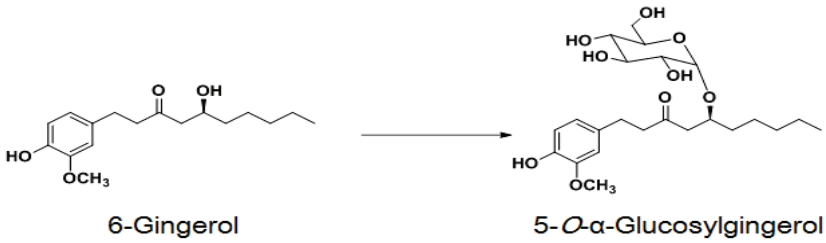
○上田 誠[1]、松本 里佳[1]、堀 渚[1]、佐藤 浩志[2] ([1]小山高専物質工学科、[2]日生バイオ株式会社)
○Makoto Ueda[1], Rika Matsumoto[1], Nagisa Hori[1], Hiroshi Satoh[2] ([1]Oyama National College of Technology, [2]Nissei Bio Co.)

【目的】ショウガ活性成分の 6-ジンゲロールには殺菌作用、脂肪蓄積防止作用などの生理作用がある。しかし、6-ジンゲロールは水に不溶であり、また強い辛味と刺激臭を持つことから 6-ジンゲロールの応用分野並びに使用量は限定されている。一般にポリフェノール類は配糖化することにより水溶性や刺激性の改善が可能であり、フェノール性水酸基を受容体とした酵素反応例は多い。そこで、我々はアルキルアルコールを配糖化する酵素活性を探索し、土壌から分離した細菌からマルトースをドナーとする 6-ジンゲロールの配糖化活性を見出した[1,2]。本研究は、*Ensifer* sp. M-26 株による 6-ジンゲロール配糖化反応の特性を調べる事を目的とする。

【方法】微生物の培養はマルトース等の糖質を主炭素源とする培地で培養し、洗浄菌体を調整し反応に用いた。微生物反応は、6-ジンゲロールが難溶性であるため反応液中にヘキサンを添加し激しく攪拌することにより行った。反応温度や pH の影響は反応初速度を求めることにより行った。生成 5-α-Glc-gingerol の分析は TLC および HPLC を用いた。

【結果】*Ensifer* sp. M-26 株の洗浄菌体を用いて配糖化反応の至適条件を検討した結果、至適温度は 40℃、至適 pH は 7.0 付近であった。また、配糖体の蓄積濃度は反応液中のマルトース濃度の向上により増加した。経時的な変換反応では、1.3g/l の 6-ジンゲロールから反応 25 時間で 0.40g/l の 5-α-Glc-gingerol の蓄積を確認し、反応のモル収率は 19.9%であった。また、反応液から優先晶析により取得した 5-α-Glc-gingerol の物性等についても報告する。

1）上田　誠，佐藤　浩志、配糖体の製造方法、特開 2016−28568
2）松本　里佳，佐藤　浩志，上田　誠、日本農芸化学会 2016 年度大会講演要旨集 4F170




6-gingerol, Microbial glucosylation, Ensifer sp.

発表責任者：上田　誠（mueda@oyama-ct.ac.jp）

講演番号：3J27a01
講演日時：3 月 19 日 09:20～ J 校舎 27 会場

# 難分解性芳香族化合物資化性好熱性細菌の探索と機能解析

# Isolation and characterization of hardly decomposable aromatic compound degradation thermophilic bacteria

○徳田 裕太[1]、夷子 博将[2]、岩田 健一[1] ([1]芝工大院シ、[2]芝工大シ生)
○ Yuta TOKUTA[1], Hiromasa EBISU[2], Kenichi IWATA[1] ([1]Graduate School of Systems Engineering and science, Shibaura Institute of Technology, [2]Department of Bioscience and Engineering, Shibaura Institute of Technology)

【背景・目的】石油中に存在する多環芳香族化合物であるナフタレンやフェナントレン（PHE）、複素環式化合物であるカルバゾール（CAR）は難分解性芳香族化合物であり、ベンゼン環を複数持つ安定な構造を持つため分解されにくい。そのため環境中に長く残存し、生物に影響を与えることから自然環境中への拡散防止や除去の技術が必要となっている。環境浄化の手法の中で生物を用いるものをバイオレメディエーションと呼び、低濃度広域に渡る汚染に対し有効であり，様々な環境汚染物質の分解菌が単離され、研究されている [Nojiri *et al.*, 2001, J. Bacteriol., 183:3663-79.]。また、好熱性細菌とは至適生育温度が 45℃以上あるいは生育限界温度が 55℃以上の微生物である。酵素の変性温度の上限は生物の生育限界温度と深く関わっているため、好熱性細菌の持つ酵素は一般的な酵素の変性温度（約 60℃）の環境でも壊れない耐熱性を有している。また耐熱性酵素はその構造の安定性から pH 耐性や塩濃度耐性も有しているため、他の環境に対する耐性も高いことが報告されている [Akanuma et al., 1998, Protein Sci., 7,698—705.]。そのためこれらの酵素は工業利用に有用であり、注目されている。

そこで本研究では温泉水や耐熱菌を有している可能性を持つ土壌、海水から難分解性芳香族化合物資化性の好熱菌や耐熱菌を取得し、それらの分解遺伝子ならびに、耐熱性酵素の機能解析を目標とする。

【方法・結果】好熱性、耐熱性細菌をターゲットとしているため、温泉水や海水、土壌を菌源とし、CAR や PHE を唯一の炭素源とした培地を用いて 60℃にて集積培養を行った。これによって単離された 2 株の CAR 資化性好熱性細菌(TR01 株、TR03 株)について、16S rDNA を用いた系統解析法を用いた属種推定を行い、TR01 株は *Bacillus* sp. SP93 と TR03 株は *Geobacillus* sp. WCH70 と 99%の相同性を示した。また、長崎海洋水を菌源とし培養したものに菌の生育が確認されたため、単離を目指した。さらに、TR01 株で他の CAR 分解遺伝子所有株(*Pseudomonas resinovorans* CA10 株、*sphingomonas* sp. CB3 株、*sphingomonas* sp. RW1 株、*Pseudomonas putida* G7 株、*Nocardioides aromaticivorans* IC177 株)の CAR 分解遺伝子から作製された Degenerate primer を用いた PCR を行い、分解遺伝子の取得を試みた結果、IC177 株由来の primer でのみ分解遺伝子群と同塩基付近に DNA の増幅が確認された。また、TR01 株、TR03 株の CAR 分解に関する遺伝子の取得を行うため、ショットガンクローニング法による CAR 分解遺伝子の取得を行った。

Biodegradation, carbazole, thermophilic bacteria

発表責任者：徳田裕太（mf16044@shibaura-it.ac.jp）

講演番号：3J27a02
講演日時：3 月 19 日 09:35～ J 校舎 27 会場

# カルバゾール資化性海洋性細菌の分解系遺伝子の機能解析

# Functional analysis of carbazole degradating gene in marine bacteria

○森屋 純、岩田 健一（芝工大院シ）
○Jun MORIYA, Kenichi IWATA (Shibaura Institute of Technology)

【目的】海洋でのバイオレメディエーション(オーグメンテーション)に際して，環境浄化の発展，高塩濃度環境での微生物の応用の知見の蓄積のため，carbazole 分解細菌の多様性を明らかにすることを目的とし,当研究室で所有する 3 株(*Erythrobacter* 属, *Brevundimonas* 属 , *Labrenzia* 属)株についての諸性質の解析と,carbazole 分解能を有する新規海洋性細菌の単離・属種推定を行なった。
【方法】日本各地から海水を採取し,集積培養にて単離を行い,属種推定をした．1.00～7.00%の異なる塩濃度の液体培地を用意し，塩濃度耐性試験を行った.Carbazole 以外の異なる基質での生育基質特異性の確認をした.基質は carbazole, naphthalene, dibenzofuran, pyrene, phenanthrene, Anthracene の 6 種類を使用した．異なる pH で調整した培地を用意し,生育 pH を確認した.ガスクロマトグラフィー・質量分析法(GC-MS)による中間代謝物の確認を行った.既に代謝経路が明らかにされている *Pseudomonas resinovorans* CA10 株から代謝経路でアントラニル酸が生成しているかどうかの確認を行った.CAR 分解遺伝子に関わる遺伝子を所有するかを確認するため,数種類の primer(CS,AJ,pPAH,Rieske,IC177primer)[1]を用いて DNA 内に増幅が見られるかを PCR 行い,シーケンス解析をした.CAR 分解に関する遺伝子の取得を行うため,Shotgun cloning 法による CAR 分解に関わる遺伝子の取得を試みた[2]. Shotgun cloning 法を用いて transformation を行ったコロニーに 2,3-DHBP を散布し,car 遺伝子を持つコロニーの選別を行った.
【結果】16S rDNA 解析を行った結果,*Brevundiomonas, Kokuria, Labrenzia, Thalassospia* に属する菌体と 99%の相同性を示した.塩濃度測定では,2 週間液体培養を行った結果,塩濃度約 1.00～4.00%の培地での生育が確認できた.それ以上の塩濃度での生育は確認できなかった.生育基質特異性では,色変化・基質量から CAR, naphthalene の分解能があると示唆された.OC33S について GC-MS による中間代謝物の確認した結果アントラニル酸の生成が見られた.そのため,CA10 株と同様の代謝経路であると考えられる.数種類の primer を用いて PCR をし,電気泳動した結果 AJ primer を用いた PCR のみ増幅が確認されたため,初発酸化に関する遺伝子配列である可能性が示唆された.Car 遺伝子の取得では,2,3-DHBP 散布後コロニーが黄色に呈していることから,メタ開裂が行われており,Car 遺伝子の取得ができたと考えられる.

【参考文献】 [1]Maeda et al., 2009 (FEMS Microbiol Lett)
[2]Oba et al., 2014(Biosci Biotechnol Biochem)

bioaugmentation, Carbazole, *Erythrobacter*

講演番号：3J27a03
講演日時：3 月 19 日 09:50～ J 校舎 27 会場

ヒ素超蓄積植物モエジマシダを用いたヒ素汚染土壌の浄化
Phytoremediation of arsenic-contaminated soil using arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata*
○宮内 啓介[1]、黄 毅[2]、高木 正樹[1]、東海林 翼[1]、北島 信行[3]、井上 千弘[2]、遠藤 銀朗[1]([1]東北学院大工、[2]東北大院環境、[3]（株）フジタ)
○Keisuke Miyauchi[1], Yi Huang[2], Masaki Takaki[1], Tsubasa Tokairin[1], Nobuyuki Kitajima[3], Chihiro Inoue[2], Ginro Endo[1] ([1]Tohoku Gakuin Univ., [2]Tohoku Univ., [3]Fujita Co.)

［背景］ヒ素による環境汚染は世界規模で問題となっており、日本においても土壌・地下水のヒ素汚染が多く報告されている。日本におけるヒ素の環境基準値は、0.01mg／L 以下、また農用地（田）においては、土壌 1 kg につき 15mg 未満である。ヒ素汚染土壌の処理としては、客土による土壌の入れ替えが多くおこなわれているが、高い処理費用や運搬した汚染土壌の処理が問題となっており、有効な浄化方法が求められている。我々は、植物を用いたヒ素汚染の浄化方法に注目して研究をおこなっており、その中でもヒ素超蓄積植物であるモエジマシダを用いた汚染浄化方法の開発をおこなっている。モエジマシダは 2001 年にヒ素超蓄積植物であることが報告されており、実験室内では乾燥重量の２%がヒ素となるほど多くのヒ素を体内に取り込むことが可能な植物である。また、ヒ素を地上部である羽片に蓄積する、生産量が 1-2kg/㎡と比較的高い、等の性質のため、浄化に適した植物であるといえる。モエジマシダは日本では和歌山県以南に自生しているが、我々はモエジマシダを用いた土壌浄化法が宮城県においても適応可能かを調査するため、2012 年から宮城県内のヒ素濃度が高い圃場を用いて、現場実験をおこなっている。［方法］毎年 5 月に、約 100 ㎡の圃場に約 1000 株のモエジマシダの苗を植え、11 月まで育てた。その間、１ヶ月毎に植物と土壌のサンプリングをおこなった。植物サンプルは根、根茎、羽片に分けて乾燥重量とヒ素濃度を測定した。土壌サンプルに関しては、pH、EC を測定するとともに、表層から 30cm を直径約 7 cm の筒で抜き取り、上層と下層に分けてそれぞれ水溶出ヒ素濃度と塩酸溶出ヒ素濃度、および全ヒ素濃度について測定した。ヒ素濃度の測定には ICP-MS を用いた。［結果］モエジマシダの成長については、苗を植えた 5 月から 7 月までは大きな成長は見られなかったが、8 月から 10 月にかけて大きく成長しバイオマスが増大した。10 月から 11 月にかけては低温のため成長が止まることが明らかとなった。一方ヒ素濃度は植えた直後から増大し、8 月まで濃度上昇したのち、10 月まで 100ppm 程度に保たれた。しかし、10 月から 11 月にかけてヒ素濃度が低下したことから、成長の低下による羽片から根茎・根部へのヒ素の転流がおこっている可能性が示唆された。収穫後の計算により、シダに吸収されたヒ素の量は一年当たり最大で約 100mg/㎡であることが明らかとなった。5 年間に亘って同様の傾向が見られたことから、自生地域以北においてもモエジマシダのヒ素吸収能力は実証されたと考えられる。

arsenic, phytoremediation, fern

発表責任者：宮内啓介（kmiya@mail.tohoku-gakuin.ac.jp）

講演番号：3J27a04
講演日時：3 月 19 日 10:05～ J 校舎 27 会場

# セレン蓄積植物ブロッコリースプラウトにおける亜テルル酸還元系
# Characterization of tellurite reduction in selenium accumulator broccoli sprouts

○武田 徹、中馬 康輔（近畿大農・バイオ）
○Toru Takeda, Kosuke Chuma (Kindai Univ.)

【目的】カルコゲンのひとつであるテルル（Te）は、太陽電池や各種電子部品の材料になるなど、工業的な有用性が高く、我々の生活環境に身近なものになってきている。それに伴い、環境中に排出される水溶性のテルル酸および亜テルル酸に起因する新たな環境汚染問題が懸念されている。テルル酸および亜テルル酸はいずれも高い毒性を有し、多くの生物種に対して重篤な障害をもたらす。それゆえ、生物による Te の安全かつ効率的な回収・リサイクル技術が注目されてきている。このような状況下、微生物による Te 回収技術が最近報告されたが、植物を用いた例はほとんどない。植物において、Te は硫黄と同族であることから、根の硫酸トランスポーターにより取り込まれ硫黄同化経路で代謝されると考えられるが、その詳細は明らかになっていない。そこで本研究では、Te と同族のセレンを蓄積する能力を有するブロッコリーを用いて、亜テルル酸の取り込みと代謝、特に、亜テルル酸をテルル元素に還元する亜テルル酸還元系の存在について検討した。
【方法と結果】セレン蓄積植物に分類されるブロッコリー種子を 50%ムラシゲ・スクーグ混合塩類を含む水耕液を浸した脱脂綿上に播種し、4 日間の暗処理後、明期 14 時間（240 μmol/$m^2$/s ：24°C）／暗期 10 時間（20°C）の条件で 14 日間栽培しブロッコリースプラウトを得た。Te 添加群は亜テルル酸（Te[IV]）ナトリウムを 5～100 μM になるように添加した。Te[IV]の取り込みと蓄積を調べたところ、根では添加する Te[IV]濃度の増加に伴って多くの Te[IV]が認められたが、地上部では、50 μM 以上の添加群においてのみ、わずかな蓄積が認められた。Te 添加群の過酸化脂質量を野生株と比較した。50 μM 以上の添加群の過酸化脂質量は、野生株の 1.4～2.2 倍にまで増加していた。この結果より、地上部での Te[IV]蓄積は細胞内での顕著な酸化的障害の原因になることが考えられた。粗酵素レベルでの Te[IV]還元活性を調べた。フェレドキシン依存の亜硫酸還元活性が認められたことから、同様の反応系で Te[IV]還元活性を測定したが活性は得られなかった。フェレドキシン以外の電子供与体を用いたところ、NADH 依存の Te[IV]還元活性が認められた。この NADH 依存の Te[IV]還元活性は Te 添加群において 2.48 ± 0.21 倍に上昇していた。以上のことから、植物体内に取り込まれた Te[IV]は、硫黄同化とは異なる代謝系で還元される可能性が示唆された。現在、Native PAGE 後の活性染色により、Te[IV]還元酵素の同定を試みている。

tellurite, broccoli sprouts

発表責任者：武田　徹（t_takeda@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：3J27a05
講演日時：3 月 19 日 10:20～ J 校舎 27 会場

セレン酸還元細菌 *Pseudomonas stutzeri* NT-I 株を利用したセレン汚染土壌の不溶化処理（その１）
Bioremediation of selenium contaminated soil using selenate reducing bacterium *Pseudomonas stutzeri* NT-I (Part1)

○福澤 文人[1]、大塚 治[2]、山下 光雄[1]、西里 亮[3]、奥野 稔[3]、武藤 宏行[3] ([1]芝浦工大 工 応化、[2]芝浦工大 SIT 総合研究所 レアメタルバイオリサーチセンター、[3]ケー・エフ・シー)
○Fumito Fukuzawa[1], Osamu Ootsuka[2], Mitsuo Yamashita[1], Ryo Nishizato[3], Minoru Okuno[3], Hiroyuki Mutou[3] ([1]Appl.Chem.,Eng.,Shibaura Inst.Tech, [2]RMBC,Res.Org.Adv.Eng.SIT,Shibaura Inst.Tech, [3]KFC)

［目的］ セレン及びその化合物は毒物に指定されており、過剰摂取により胃腸障害や神経障害を引き起こす。また土壌中では、主に可溶性なセレン酸化物イオン（セレン酸($SeO_4^{2-}$),亜セレン酸($SeO_3^{2-}$)）として存在する。そのため、セレン及びその化合物は排水基準値や土壌汚染対策法に基づき、環境省告示第 19 号（含有量基準）150mg/kg 以下の厳しい環境基準が定められている。現在、汚染物質が亜セレン酸である土壌は鉄系薬剤を混合してセレンの溶解性を低下させる物理化学的な不溶化処理が行われている。しかし鉄系薬剤はセレン酸との反応性が低いため、汚染物質がセレン酸である土壌の不溶化は物理化学処理では困難である。そこで、現状のセレン処理方法を解決する新たな方法が望まれている。新たな処理方法として、セレン酸化物イオン（$SeO_4^{2-}$、$SeO_3^{2-}$）を無毒な元素態セレン（$Se^0$）やジメチルジセレニド（$CH_3$-Se-Se-$CH_3$）に還元する好気性セレン酸還元細菌 *Pseudomonas stutzeri* NT-I 株を用いた生物化学的処理である。NT-I 株を用いて模擬高濃度セレン含有廃水から元素態セレンやジメチルジセレニドを回収するプロセスの構築に成功していることから、最終的にはセレン汚染土壌の生物化学的処理の構築を目指して、本研究においては NT-I 株を用い高濃度セレン汚染土壌の不溶化処理を検討した。土壌含有量試験を行い、基準値以下にまで達成できることを目標とした。
［実験方法］ セレン酸ナトリウム、亜セレン酸ナトリウムを 150 mg/kg を含む模擬汚染土壌を作製した。模擬汚染土壌中に菌体濁度 $OD_{600}$=1.0 に調製した NT-I 株培養液を加え、30℃恒温器にて静置した。その後、試験汚染土壌をサンプリング(6 g/day,0～336h）した。これら土壌を各々三角フラスコに入れ、1M 塩酸 200 ml を加え、振とう撹拌した。試料を遠心分離機にかけ上清を得た。その上清を膜ろ過し、ろ液を検液とした。可溶性全セレン濃度を誘導結合プラズマ発光分光分析装置（ICP-AES）にて定量分析した。
［結果］ ICP-AES によるセレン酸を添加した試験汚染土壌の可溶性全セレン濃度は、初期値 159 mg/kg から 24h 後では、NT-I 株培養液を添加した場合は、70 mg/kg に低減した。また 336h 後では、6 mg/kg に大きく低減した。亜セレン酸を添加した試験汚染土壌では、初期値 165 mg/kg から 24h 後では、NT-I 株培養液で 95 mg/kg となった。また 336h 後では 43 mg/kg となった。NT-I 株培養液を添加することでセレン酸、亜セレン酸汚染土壌ともに土壌含有量基準値 150 mg/kg を達成することが出来た。また、24 時間といった短時間での処理が可能なことが分かった。以上のことから、セレン酸還元細菌 NT-I 株を用いた生物化学的処理はセレン汚染土壌においても有望な浄化方法だと思われる。

Selenate reducing bacteria, Biomineralization, Biovolatalization

発表責任者：福澤文人（ad13083@shibaura-it.ac.jp）

講演番号：3J27a06
講演日時：3 月 19 日 10:45～ J 校舎 27 会場

*Pseudomonas stutzeri* NT-I 株を利用したセレン汚染土壌の不溶化処理（その２）
Bioremediation of selenium contaminated soil using selenate reducing bacterium *Pseudomonas stutzeri* NT-I (Part2)

○大塚 治[1]、福澤 文人[2]、山下 光雄[1,2]、西里 亮[3]、奥野 稔[3]、武藤 宏行[3] ([1]芝浦工大 SIT 総研 レアメタルバイオリサーチセンター、[2]芝工大応化、[3]株式会社ケー・エフ・シー)
○Osamu OTSUKA[1], Fumito FUKUZAWA[2], Mitsuo YAMASHITA[1,2], Ryo NISHIZATO[3], Minoru OKUNO[3], Hiroyuki MUTOU[3] ([1]RMBC, Res. Org. Adv. Eng. SIT, Shibaura Inst. Tec., [2]Dept. Appl. Chem. Shibaura Inst. Tech., [3]KFC LTD.)

［背景］ セレン（Se）は単一鉱物として高濃度で局所的に産出することが稀な元素であり、低濃度で自然中に広く分布している。Se は主に 6 価のセレン酸や 4 価の亜セレン酸が土壌中に混在している。これらは可溶性が高く毒性を持つことから、環境省告示第 18 号により土壌溶出量 0.01 mg/L という厳しい基準が定められた。平成 22 年 4 月の改正土壌汚染対策法の施行により、自然由来の Se 汚染であっても基準値を超えた土壌の浄化処理が必要となった。現在、汚染土壌中の亜セレン酸は鉄系薬剤を混合して Se の溶解性を低下させる物理化学的な不溶化処理により浄化が行われている。しかし鉄系薬剤はセレン酸との反応性が低いため、不溶化処理による汚染土壌の浄化は困難である。そこで、現状の物理化学処理に代わる新たなセレン酸汚染土壌浄化方法が望まれている。

これまでに水溶液中のセレン酸を不溶性の元素態セレンまで還元するセレン酸還元細菌 *Pseudomonas stutzeri* NT-I 株を単離し、NT-I 株を利用した生物化学処理による廃水中の Se の不溶化回収、再資源化に成功している。そこで我々はセレン酸汚染土壌の浄化に NT-I 株による生物化学処理が応用できると考えた。セレン酸汚染土壌の Se 土壌溶出基準値達成を目指し、NT-I 株を利用した不溶化処理方法の開発を目的とした。

［実験方法］ 一般的な土壌にセレン酸を添加した模擬汚染土壌を実験に用いた。土壌 100 g にセレン酸ナトリウムを土壌溶出量 0.1 mg/L となるように添加し、72 時間風乾したものを模擬汚染土壌とした。模擬汚染土壌に滅菌済みの培地もしくは $OD_{600}$=1.0 に調製した NT-I 株培養液を添加し、38℃の恒温器で静置した。NT-I 株培養液添加 0 時間目から 72 時間目まで土壌の一部をサンプリングした。サンプリング土壌は 50℃の恒温器で 2 時間乾燥した。乾燥した土壌を 5g 定量し、50 ml の純水で 6 時間振とう溶出した。溶出液をフィルターろ過にて土壌を取り除き検液とした。検液中の Se 濃度を定量測定し Se 土壌溶出量とした。

［結果］ 模擬セレン酸汚染土壌に滅菌済みの培地のみを添加した場合、Se 土壌溶出量は 72 時間目でも初期 Se 溶出量と同等の 0.1 mg/L であった。一方 NT-I 株を添加した場合、Se 土壌溶出量は 72 時間目では 0.01 mg/L 以下であった。この値から Se 土壌溶出基準値まで低減したと思われる。Se 土壌溶出量が低減したのは NT-I 株によって模擬汚染土壌中のセレン酸は元素態セレンまで還元され不溶化したためだと示唆された。以上の結果から NT-I 株による生物化学処理が汚染土壌中のセレン酸の不溶化処理にも有効であることが示された。

Selenate reducing bacteria, Bioremediation

講演番号：3J27a07
講演日時：3 月 19 日 11:00～ J 校舎 27 会場

# 微生物代謝による放射性核種 Sr の不溶化処理に向けた浄化研究

# A new remediation method for insolubilization of radionuclide strontium in a high saline solution by biomineralization

○笠原 祐太郎[1]、堀池 巧[2]、土津田 雄馬[2]、山下 光雄[1,2]（[1]芝工大院理工、[2]芝工大 SIT 総研 レアメタルバイオリサーチセンター）

○ Yutaro KASAHARA[1], Takumi HORIIKE[2], Yuma DOTSUTA[2], Mitsuo YAMASHITA[1,2]
([1]Shibaura Inst. Tech, [2]RMBC, Res. Org. Adv. Eng. SIT, Shibaura Inst. Tech)

【目的】福島第一原子力発電所事故のため、高塩濃度の放射性核種を含む汚染水が生じている。イオン交換樹脂に放射性核種を吸着させ浄化した所、セシウム 137($^{137}$Cs)は浄化回収できたが、ストロンチウム 90（$^{90}$Sr）は低回収率であった。汚染水中に多量のナトリウムイオンが含まれ、優先的に吸着されたために、$^{90}$Sr の回収が困難であることが分かった。汚染水を減容すべく逆浸透法が用いられているが、$^{90}$Sr を含む多核種が濃縮塩水中に生成されている問題点が生じている。以前、淡水中の微生物が尿素を加水分解することによって、炭酸ストロンチウム($SrCO_3$)を含むバイオ鉱物を合成することが報告された。そこで、高塩濃度下でバイオ鉱物中に $^{90}$Sr を取り込ませて浄化回収するプロセスを構築することを最終目的とし、本研究では高塩濃度下に存在する $^{90}$Sr を回収するために、$SrCO_3$ を含むバイオ鉱物を合成する耐塩性微生物を海洋試料から単離・同定し、次に微生物によるバイオ鉱物合成に関わる特性解析を行うことを目的とした。
【方法】東京湾の 7 か所からサンプル(表層水、深層水、海底泥)を採取し、2%(w/v)尿素、0.012%(w/v)フェノールレッド、3%(w/v)塩化ナトリウムと 1.5%(w/v)寒天を含むマリン平板培地(Marine Broth,3.74g/L)に播種した。尿素分解による pH の上昇のために指示薬が変化した微生物のコロニーを選別した。初発菌体濁度が一定になるように前培養液を調整し、1mM $SrCl_2$ を含むマリン液体培地(37.4g/L)に植菌し、30℃で培養した。所定時間毎に培養液サンプルを採取し、遠心分離後の上清液を ICP-AES にて Sr 濃度を測定した。沈殿物は SEM-EDX にて形態観察・元素分析した。微生物によるバイオ鉱物合成に関わる特性を調べるために、温度、塩濃度、尿素濃度を変化させ、培養液上清中の Sr 濃度を測定した。微生物を同定するため、16S rRNA 遺伝子の塩基配列決定と系統樹解析を行った。
【結果】東京湾由来の試料より、尿素を分解し培養液から Sr を除去する微生物 3 株(YK2,YK42,YK55)を単離した。これら 3 株の内、YK42 株が培養開始 12 時間にて Sr 除去率 100%を示し最も速く Sr を除去した。YK42 株の培養開始 6 時間目の沈殿物を SEM-EDX で観察した所、Sr、Ca、C、O の局在性が同じであった事から、Sr と Ca を含む炭酸塩（バイオ鉱物）が合成されたと示唆された。YK42 株の特性解析の結果、塩濃度 0.3%～5.0%、温度 20℃～40℃、尿素濃度 2.0%の条件下で 48 時間以内には Sr 除去率 99%を示した。YK42 株の 16S rRNA 遺伝子の相同性などを調べた所、YK42 株は *Sporosarcina saromensis* と同属種であった。これまで本同属種から Sr を含む炭酸塩を合成した報告が見当たらないことから、微生物代謝による $^{90}$Sr の新規な不溶化処理の可能性を見いだした。

Bioremediation, marine environment, urealytic bacteria

発表責任者：笠原 祐太郎（mc16006@shibaura-it.ac.jp）

講演番号：3J27a08
講演日時：3 月 19 日 11:15～ J 校舎 27 会場

# 在来乳酸菌を活用した島豆腐おからサイレージの開発

# Development of Shima-tofu Okara silage by using native lactic acid bacteria

○高屋 朋彰、大嶋 旭昇、エンフバータル ブルガン（小山高専・物質）
○Tomoaki KOUYA, Akinori OSHIMA, Bulgan ENKHBAATAR (NIT. Oyama Col.)

【背景・目的】現在，国内で生じるおからの約 1%は食品に利用されているが， 99%は飼肥料・廃棄されているのが実情である．おからの有効利用における課題として，腐敗が早く長期貯蔵が困難なため，処分（焼却・乾燥など）や飼料化（乳酸菌製剤の添加など）にコストがかかることが挙げられる．そのため、長期間にわたって保管・再利用できる簡易・安価なおからの処理法が求められている．本研究では，沖縄豆腐の副産物として得られる島豆腐おからに着目した．通常，豆腐の製造時に副産物として生じるおからは，加熱後に圧搾を行うことで得られるが，沖縄豆腐（島豆腐）は圧搾後に得られた豆乳を加熱して製造されることから，生じるおからは非加熱となり，在来の乳酸菌が残存しやすいと推察された．そこで本研究では，沖縄豆腐の副産物である島豆腐おから中の在来乳酸菌の種類を同定し，低コストで高品質な島豆腐おからサイレージの開発を目的とした．
【方法】島豆腐おからと生理食塩水を混釈して MRS 寒天培地に塗布し, 30℃・72 h の嫌気培養を行った．得られた菌株に対するカタラーゼ試験および乳酸生産量の評価を行った．単離した乳酸菌の同定は 16S rDNA 配列解析により行った．次に，島豆腐おからに対する炭素源添加の影響を評価した．島豆腐おからに対して 1%(w/w)のグルコース，または 2%(w/w)の廃糖蜜を添加した．また，対照試験として糖を添加しない条件を検討した．一定期間ごとにサンプリングを行い，pH，有機酸濃度，可溶性全糖濃度，および乳酸菌と酵母の生菌数を継時的に測定することにより，島豆腐おからの保存性を評価した．スケールアップ試験では，島豆腐おから 2 t に対してグルコースを 1%（w/w）の割合で添加し, 224 日間の培養を行った. 外気温, おから内温度, pH, 有機酸濃度, 乳酸菌と酵母の生菌数, VBN/TN を測定し，得られた結果からサイレージの品質評価（フリーク評点および V-score）を行った．
【結果】島豆腐おから中から，*Lacotobacillus* 属や *Leuconostoc* 属の乳酸菌を検出した．島豆腐おからに糖を添加しない場合，培養 7 日目までに酵母数の増加および pH の上昇が確認された．一方，廃糖蜜またはグルコースを添加した場合，培養 4 日目には pH が 4.1 程度まで低下し，培養 112 日目まで維持された．また，グルコースを用いた場合に島豆腐おから中の乳酸量が最も増加することが明らかとなった. スケールアップ試験の結果, 培養 224 日間において pH4.0～4.3 程度で維持できること，乳酸菌が高い菌数（$10^9$/ g おから）で推移すること，フリーク評点（65(良)～95(優)）および V-score（83.1(良)～98.8(良)）が高い品質で維持できることが明らかとなった．

Shima-tofu Okara, lactic acid bacteria, silage

発表責任者：高屋 朋彰（tkouya@oyama-ct.ac.jp）

講演番号：3J27a09
講演日時：3 月 19 日 11:30～ J 校舎 27 会場

# こんにゃく飛粉の糖化液と培養資源としての検討

# Hydrolyzate of konjac powder and its application in microbial cultures

○宮越 俊一[1]、大竹 遥[1]、石田 悠[1]、福本 亮平[2]、鎌田 直[2]、高田 式久[3]（[1]群馬高専、[2]群栄化学工業、[3]雪国アグリ）
○Shunichi Miyakoshi[1], Haruka Odake[1], Yu Ishida[1], Ryohei Fukumoto[2], Naoshi Kamata[2], Norihisa Takada[3] ([1]National Institute of Technology, Gunma College, [2]GUN EI Chemical Industry Co., Ltd., [3]Yukiguni Aguri Co., Ltd.)

【目的】　こんにゃくの製造過程で生ずる微粉末である「飛粉」は，グルコマンナンをあまり含まずこんにゃくにならないものの，アミノ酸，ミネラルなどの成分を多く含んでいる。本研究では飛粉を糖化し，その培養資源としての有効性について検討することを目的とした。
【材料及び方法】　こんにゃく飛粉をアミラーゼおよびプロテアーゼにより酵素処理することにより糖化し，子の糖化液を各種発酵生産のための培地成分として添加することで，発酵生産性の向上効果について検討した。乳酸生産性は，群馬高専構内にて分離された *Lactococcus lactis* SP-1 株，*Lactobacillus plantarum* SP-2 株を用いてその培養液に飛粉を添加して培養し，有機酸分析用カラムを用いた HPLC により定量した。抗生物質生産に及ぼす効果としては，ペプチド系抗生物質 daptomycin （A21978）類生産菌 *Streptomyces roseosporum* ATCC 31568 株を用いてその生産培地で培養し，培養液を Sep-pak $C_{18}$ カートリッジで前処理の後，逆相分配系 HPLC により daptomycin 類を分離，定量することにより，比較検討した。
【結果及び考察】　*L. lactis* を用いた乳酸生産性への飛粉糖化液の効果の検討の結果，3 % の添加により，乳酸生産性は 2.2 % から 3.6 % に増大し，ポリペプトン 1 % の添加効果とほぼ一致した。ダプトマイシン生産性は 3 % の飛粉糖化液の添加のみで， 1.4 % から 2.6 % に増大した。ダプトマイシン生産性は発表者らの予備的な検討により，各種アミノ酸の添加で生産性が向上し，とくに L-トリプトファンが著しい添加効果を示すことが確かめられている。このたび，L-トリプトファンと飛粉糖化液の相加・相乗効果を検討した結果，各成分併せた無添加時の生産量が 50μg/mL 以下であったのに対し，20 mM の L-トリプトファンと 3 % の飛粉糖化液を併せて添加することにより，500 μg/mL に達した。以上のことから，飛粉糖化液は微生物培養資源として，とくにアミノ酸源としてカゼイン水解物であるペプトン類に代替しうる培地成分として有効であることが示された。そのアミノ酸組成はロイシン，バリンといった分岐アミノ酸やアルギニン，ファニルアラニン等を多く含む点で，カゼインその他の由来の培養原料と異なった特徴を備えており，その特性を活かした培養資源としての応用展開が期待される。

konjac powder, hydrolyzate, microbial culture

発表責任者：宮越俊一（miyako@nat.gunma-ct.ac.jp）

講演番号：3J27a10
講演日時：3 月 19 日 11:45～ J 校舎 27 会場

油脂資化性酵母のラードを炭素源とした場合の培養について
Cultivation of Lipid Assimilating Yeast on Lard as a Sole Source of Carbon.
○小林 由衣乃[1]、日下部 征信[1]、竹園 恵[1]、中島 敏明[2]、茂野 俊也[3]、小野寺 正幸[1]([1]新潟工大工、[2]筑波大院生命環境、[3]つくば環微研)
○Yukino KOBAYASHI[1], Masanobu KUSAKABE[1], Satoshi TAKESONO[1], Toshiaki NAKAJIMA[2], Toshiya SHIGENO[3], Masayuki ONODERA[1] ([1]Niigata Inst. Tech., [2]Tsukuba Univ., [3]Lab. Tsukuba Env. Microbio.)

【目的】家庭、外食産業、食品工場等から排出される廃食用油の有効活用として、安価な窒素源の添加により微生物菌体を培養し、家畜並びに養魚用の飼料の生産を目指している。一昨年の本大会で、植物油を炭素源とした培養特性について報告した。[1)]今回は、動物性食用油として市販のラードを用い、油脂資化性酵母における三角フラスコでの回転振盪培養について検討を行った。
【方法と結果】菌株として油脂資化性酵母 *Meyerozyma guilliermondii* TY-89 株を用いた。GPY 培地(グルコース 10g/L、ポリペプトン 5g/L、酵母エキス 3g/L)で、30℃、24 時間回転振盪培養したものを前培養とした。本培養として基本となる培地は、C 源として市販のラード 10g/L、N 源として硫酸アンモニウム 2g/L、その他無機塩からなる無機塩培地(LIA 培地)とした。500mL 容三角フラスコ(培地量 100mL、シード接種量 4mL)で 30℃、120rpm の回転振盪培養を行った。菌体量は Whatman 製 glass microfiber filters, Grade GF/B を用いた乾燥菌体重量法によって測定した。

最初に三角フラスコのバッフルの有無での増殖への影響について検討した。バッフル有りの三角フラスコを用いた場合は 72 時間で約 4.5g/L の菌体量を得、pH は 1.9 まで低下した。一方、バッフル無しの通常の三角フラスコを用いた場合、72 時間で約 1.9g/L、pH は 2.4 であった。ラードを炭素源とした場合も植物油を炭素源とした場合と同様にバッフルの効果が認められた。しかし、植物油の場合は、48 時間で菌体量が約 6g/L、pH は 2.3 であり、ラードを炭素源とした場合、菌体収量の低下と pH の低下が認められた。今回使用したラードは、50℃では完全に溶融していたが、40℃以下では完全に溶融していなかったため、培養温度を 35℃と 40℃でバッフル有りのフラスコにて培養を行ったところ、35℃では生育は認められたが生育速度が低下し、40℃では生育が認められなかった。次いで、GPY 培地のグルコースをラードに代えた LPY 培地での培養を行ったところ、pH がアルカリ側へシフトして 72 時間で約 1.5 g/L、ｐH は 8.8 であった。なお、バッフル無しの三角フラスコを用いて GPY 培地で培養したところ、24 時間で約 4.1 g/L、ｐH は 6.3 であった。今後、培地組成のさらなる検討と植物油を炭素源とした場合に有効であったアンモニア水の添加による pH の調整などの検討を行う予定である。

1) 佐藤、竹園、中島、茂野、小野寺、日本農芸化学会 2015 年度講演要旨集、2C25p12.

Yeast, Lard, SCP

発表責任者：小野寺正幸（onodera@acb.niit.ac.jp）

講演番号：3J27p01
講演日時：3 月 19 日 14:00～ J 校舎 27 会場

# 焼酎粕を用いた微生物燃料電池の運転条件の検討

# Operating condition optimization of microbial fuel cells using shochu lees

○飯ケ谷 玲央、井上 謙吾（宮崎大院農）
○Reo IIGATANI, Kengo INOUE (Miyazaki Univ.)

【背景・目的】焼酎粕とはアルコール発酵したもろみを蒸留した後の残渣物である。焼酎粕は酸性度や有機物濃度が高いといった特徴をもち、活性汚泥法などによる適切な処理を行ってから廃棄する必要がある。微生物燃料電池（Microbial fuel cell, MFC）は、有機物の処理と同時に発電のできる装置であり、MFC は大きさや数を設備に合わせて変更可能であることなどからも、既存の技術に比べて優位性があると考えられる。そこで、本研究グループでは、カセット電極 MFC を用いて、焼酎粕の処理と発電の検討を行ってきた。その結果 COD 濃度 10,000 mg/L に希釈した焼酎粕を用いたときに、発電効率と処理効率共に最も高いことが明らかになった。本研究では、さらに高い発電効率をめざし、スタック型 MFC を用いて発電を評価した。スタック型 MFC は MFC を積層していくことで大規模化が可能な装置であるが、積層する 1 単位のスタック型 MFC の最適なサイズについての知見はない。そこで今回は 3 つのサイズのスタック型 MFC を用いて、アップサイジングよって発電と処理効率にどのような影響があるかについて評価した。
【方法・結果】100 × 100× 30 mm のスタック型 MFC（内容積 300 mL）に COD 濃度 10,000 mg/L に希釈した焼酎粕を充填し、16 日間運転を行った。焼酎粕希釈液は 10 mL/min で循環させた。温度は 30℃、抵抗は 470Ω とした。その結果、平均電力密度は 890 mW/m$^3$、最大電力密度は 3,766 mW/m$^3$ を記録し、同期間のカセット電極 MFC（内容積 300 mL）の平均電力密度 354 mW/m$^3$、最大電力密度 1,166 mW/m$^3$ と比較して高い値となった。

また、スタック型 MFC の最適なサイズの検討のため、100 × 100× 30 mm、150 × 150× 30 mm、200 × 200× 30 mm（それぞれ内容積 300、700、1,200 mL）の 3 つのスタック型 MFC を用いて同様に運転を行った。この際、焼酎粕は遠心分離してその上清を COD 濃度 10000 mg/L に希釈したものを用い、希釈液は HRT1 時間で MFC 内を循環させた。運転は、6 日間、温度 30℃で行った。外部抵抗は初め 470 Ω に設定し、適宜変更した。運転の結果、平均電力密度は、100 × 100× 30 mm、150 × 150× 30 mm、200 × 200× 30 mm でそれぞれ 1,591 mW/m$^3$、1,397 mW/m$^3$、1,076 mW/m$^3$ であり、100×100×30 mm のスタック型 MFC で最も平均電力密度が高かった。最大電力密度はそれぞれ、3,604 mW/m$^3$、3,532 mW/m$^3$、3,550 mW/m$^3$ でほぼ同程度であった。COD 除去効率はそれぞれ、13.7%、42.4%、22.0%であった。現在、最も平均電力密度の高かった 100×100×30 mm の電池内の微生物群集構造について解析中である。

shochu lees, microbial fuel cells, acidic waste

講演番号：3J27p02
講演日時：3 月 19 日 14:15～ J 校舎 27 会場

# 微生物燃料電池の発電に必須な OmcZ の生産メカニズムの解明と機能解析

# Functional Analysis of OmcZ Essential for Current Production in Microbial Fuel Cells

○甲斐 絢子、徳石 崇宏、河野 好裕、榊原 陽一、水光 正仁、井上 謙吾（宮大院農）
○Ayako KAI, Takahiro TOKUISHI, Yoshihiro KAWANO, Yoichi SAKAKIBARA, Masahito SUIKO, Kengo INOUE (Miyzaki Univ.)

【背景および目的】鉄還元菌 *Geobacter sulfurreducens* は、有機物を代謝する過程で生じた余剰の電子を電極に伝達することができるため、微生物燃料電池での発電が可能である。微生物燃料電池とは、微生物を使って有機物の化学エネルギーを電気エネルギーに変換する装置である。*G. sulfurreducens* の標準株である PCA 株は 111 個の *c* 型シトクロム遺伝子を有しており、これまでに OmcZ および ImcH が微生物燃料電池での発電に重要な *c* 型シトクロムであることが明らかになっている。OmcZ は大小 2 つのサイズ（$OmcZ_S$、$OmcZ_L$）で存在し、N 末端および C 末端のアミノ酸配列や分子量から、$OmcZ_S$ は $OmcZ_L$ が切断されることで生成されるとされている。$OmcZ_L$ が細胞内部（ペリプラズム）に多く局在しているのに対し、$OmcZ_S$ は細胞外へ分泌され、微生物燃料電池のバイオフィルム内では主に細胞外マトリクスに局在し、発電中は電極表面に蓄積する。本研究では、発電に必須な $OmcZ_S$ の生産メカニズムの解明を目的として、$OmcZ_L$ から $OmcZ_S$ を生産する過程に関わると予測される遺伝子の機能解析を行った。また $OmcZ_S$ のより詳細な機能解析を目的として、抗 OmcZ 抗体を用いた共免疫沈降を行った。

【実験方法および結果】*omcZ* 遺伝子（GSU2076）の直下流に位置しており、Subtilisin 様プロテアーゼをコードする遺伝子（GSU2075）を *ozp*（OmcZ Protease）と命名した。*ozp* を破壊したところ、*ozp* 破壊株では $OmcZ_L$ が蓄積しており、$OmcZ_S$ が正常に生産されていないこと、また発電能力が著しく低下することが分かった。*ozp* 相補株では、$OmcZ_S$ が正常に生産されており、また発電能力にも部分的に回復していた。さらに Ozp を発現する組み換え大腸菌の粗酵素液と *ozp* 破壊株の細胞表層タンパク質画分（$OmcZ_L$ を多く含み、$OmcZ_S$ を含まない）を用いて粗酵素反応を行った結果、Ozp によって $OmcZ_L$ が切断され OmcZs が生産されることが確認できた。これらの結果から、Ozp が直接 $OmcZ_L$ を切断していると決定づけられた。

現在、抗 OmcZ 抗体を用いて共免疫沈降を行い、$OmcZ_S$ と相互作用するタンパク質を探索している。抗 OmcZ 抗体は、$OmcZ_S$ 過剰発現株である ZKI 株から界面活性剤抽出法にて精製した $OmcZ_S$ 溶液を用いて作製した。Ozp をはじめとするタンパク質が得られることを期待している。

*Geobacter sulfurreducens*, Microbial Fuel Cells, *c*-type cytochrome

発表責任者：甲斐絢子（gc12015@student.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：3J27p03
講演日時：3 月 19 日 14:30～ J 校舎 27 会場

# 超好熱菌由来酵素を用いた L-プロリンを基質とする燃料電池の構築

# L-proline/oxygen biofuel cell using enzyme from hyperthermophilic archaeon

○殿岡 愛菜[1]、田中 志乃[2]、小松 丈紘[1]、山崎 晃司[1]、坂元 博昭[1,5]、里村 武範[2,5]、櫻庭 春彦[3]、大島 敏久[4]、末 信一朗[1,2,5]（[1]福井大院・ 工・繊維、[2]福井大院・工・生物応用化、[3]香川大農、[4]大阪工大、[5]福井大・生命セ）

○ AINA TONOOKA[1], SHINO TANAKA[2], TOMOHIRO KOMATSU[1], KOUJI YAMAZAKI[1], HIROAKI SAKAMOTO[1,5], TAKENORI SATOMURA[2,5], HARUHIKO SAKURABA[3], TOSHIHISA OSHIMA[4], SHIN-ICHIRO SUYE[1,2,5] ([1]Dept. Front. Fib., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [2]Dept. Appl. Chem. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [3]Kagawa Univ., [4]Osaka Inst. Tech., [5]Res. Edu. Prog. Life Sci., Univ. Fukui)

**[諸言]** 酵素の触媒反応を用いて有機資源から電気エネルギーを得るバイオ電池は環境負荷の少ない次世代エネルギーの一つとして注目されているが、実用化へ向けた課題も残されている。たとえば、これまでのバイオ電池の多くは、食糧であるデンプンから得られるグルコースを燃料に用いたものであり食糧との競合が懸念される他、酵素自体に起因する長期安定の低さや出力の低さの問題を有するため実用化にはさらなる性能の向上が求められている。そこで、本研究では長期安定性を有する超好熱菌由来の酵素を修飾した高い表面積を有するケッチェンブラック(KB)を基材としたバイオ電池を提案した。長期安定性を有する超好熱性アーキア *Aeropyrum pernix* 由来の L-プロリン脱水素酵素(LPDH)を修飾したアノード、ラッカーゼと KB を修飾したカソードで構成される、長期利用可能・高出力な L-プロリンを燃料とするバイオ電池を作製・評価した。

**[方法]・LPDH 修飾アノードの作製** 酸化処理によって導入したカーボンクロス(CC)上のカルボキシル基をカルボジイミドによって活性化した。ここに 5 mg/ml LPDH 溶液を 50 µl 滴下し 4℃で 1 時間静置し酵素表面のアミノ基とアミド結合を形成させた後、未反応の酵素を緩衝溶液で洗い流しアノードを作製した。

**・ラッカーゼ修飾カソードの作製** 炭素微粒子である KB とポリフッ化ビニリデンを質量比 4:1 で混合した溶液を CC 表面に塗り広げ、60℃で 12 時間乾燥させた。10 mg/ml ラッカーゼ溶液を 250 µl 滴下し、4℃で 2 時間吸着させ、未吸着の酵素を洗い流し、カソードを作製した。サイクリックボルタンメトリ(CV)によって作製電極について KB の効果を評価した。

**・バイオ電池の評価** 作成したアノードでは基質の 100 mM L-プロリンとメディエータとして 0.5 mM フェロセンカルボン酸を含む pH 6.5 の緩衝液溶液、カソードでは基質の酸素で飽和させた pH 4.0 の緩衝溶液を電解質とし、ナフィオン膜のセパレータを用いてバイオ電池を構成した。40℃条件下でリニアスイープボルタンメトリを行い、バイオ電池の出力を評価した。

**[結果と考察]** CV の結果よりラッカーゼ修飾アノードにおいて KB を修飾した場合はしない場合の 13.5 倍の電流値の増大が示された。これは、KB の高い表面積により、酵素の修飾量が増加したためだと考えられる。LPDH を修飾した CC アノードとラッカーゼと KB を修飾したカソードで構成されるバイオ電池の出力は、0.23 V のとき 20 µW/cm$^2$ であり、開回路電位は 0.69 V であった。電極の安定性については現在、検討中である。

biofuel cell, L-proline, hyperthermophilic archaeon

発表責任者：殿岡愛菜（tonookaa@biofiber-fukui.com）

講演番号：3J27p04
講演日時：3 月 19 日 14:45～ J 校舎 27 会場

# バイオ電池への応用を目的としたデバイス上へのマルチエンザイムシステムの構築

# Construction of multi-enzyme system on the devise for the biofuel cells

○小松 丈紘[1]、山﨑 晃司[1]、坂元 博昭[1,3]、里村 武範[2,3]、櫻庭 春彦[4]、大島 敏久[5]、末 信一朗[1,2,3]
([1]福井大院・工・繊維、[2]福井大院・工・生物応用化、[3]福井大学・生命セ、[4]香川大農、[5]大阪工大)
○Tomohiro KOMATSU[1], Kouji YAMAZAKI[1], Hiroaki SAKAMOTO[1,3], Takenori SATOMURA[2,3], Haruhiko SAKURABA[4], Toshihisa Ohshima[5], Shin-ichiro SUYE[1,2,3] ([1]Dept. Front. Fib., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [2]Dept. Appl. Chem. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [3]Res. Edu. Prog. Life Sci., Univ. Fukui, [4]Kagawa Univ., [5]Osaka Inst. Tech.)

［諸言］
これまでのバイオ電池 (BFC)は常温菌由来の酵素が電極触媒として用いられており、酵素の安定性の低さが電池寿命低下を招くことが問題となっている。既に我々は超好熱性アーキア由来の酵素を用いた高い安定性を有する BFC 用電極を構築した。また一方では複数の酵素を用いた多段階酵素反応系 BFC 用アノードは基質一分子からより多くの電子の抽出が可能であり出力の増大が期待されている。本研究では L-プロリンを開始基質としてピロリン-5-カルボン酸､L-グルタミン酸を介した 2-オキソグルタル酸を経る多段階酵素反応系を触媒する超好熱性アーキア由来の 4 種の脱水素酵素 (*Aeropyrum pernix* 由来色素依存性 L-プロリン脱水素酵素 (LPDH)、*Pyrococcus horikoshii* 由来色素依存性 L-プロリン脱水素酵素及び NADH 脱水素酵素をサブユニットに含む脱水素酵素複合体 (PDH)、*Thermus thermophilus* 由来 NAD 依存型ピロリン-5-カルボン酸脱水素酵素 (P5CDH)、*Pyrobaculim islandicum* 由来 NAD 依存型グルタミン酸脱水素酵素 (Pis-GDH))を用いて、L-プロリンを燃料とした多段階酵素反応系を用いて NADH とメディエータを介した電極との電子伝達を行う BFC 用アノードの構築を検討した。

[実験]
自己組織化単分子膜 (SAM)を用いた 4 酵素の金電極上の固定化　ニトリロ三酢酸 (NTA)基とスクシンイミド (NHS)基を末端に有したジスルフィド溶液を用いて金電極表面へ混合 SAM を形成した。その後 P5CDH と Pis-GDH を共有結合で固定化し、NTA 基に $Ni^{2+}$を配位させ LPDH と PDH を末端に導入されたヒスチジンタグと $Ni^{2+}$との相互作用により電極に配向固定化した。この電極を用いて、本多段階酵素反応系における電極上への電子伝達の有無を確認するために電気化学的評価を行った。
4 酵素における酵素反応系の電気化学的評価　三電極方式によりフェロセンカルボン酸をメディエータとして用いてサイクリックボルタンメトリー (CV)測定を行うことで酵素電気化学反応を評価した。

[結果・考察]
4 酵素固定化電極に対して酵素電気化学反応の評価を行った結果、酵素の足場となる混合 SAM のモル比が等しく、4 酵素の分子数も等しい時に基質であるプロリンと補酵素である $NAD^+$存在下において酸化ピーク電流 ($I_{pa}$)の増大が確認された (639 nA/cm$^2$)。このことより L-プロリンから 2-オキソグルタル酸までの多段階酵素反応系において電極上への電子伝達が行われたと推察される。

biofuel cell, bioanode, bio-device

講演番号：3J27p05
講演日時：3 月 19 日 15:00～ J 校舎 27 会場

*Shewanella oneidensis* MR-1 株における水素酸化に伴う電流生成機構
Current generation from hydrogen by *Shewanella oneidensis* MR-1
○廣瀬 篤弥、高妻 篤史、渡邉 一哉（東薬大生命）
○Atsumi HIROSE, Atsushi KOUZUMA, Kazuya WATANABE (Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.)

【背景と目的】近年、電極との間で電子の授受を行う能力を持つ微生物が注目を集めている。*Shewanella oneidensis* MR-1 株は電極への電子伝達が可能な細菌であり、モデル発電菌として広く研究されている。MR-1 株は有機物を電子源として電流を生産する従属栄養細菌であるが、水素代謝に関与すると予想されるヒドロゲナーゼ遺伝子をゲノム上に 2 つ（*hyaB* と *hydA*）有している。しかし、MR-1 株は $CO_2$ 固定能力を持たず、これらのヒドロゲナーゼの生理学的な役割については不明である。また、本株が水素をエネルギー源として利用するという報告はない。そこで本研究では、MR-1 株におけるヒドロゲナーゼの生理学的役割を解明することを目的に、遺伝子破壊株の水素代謝能や電流生産能について調査した。
【方法と結果】MR-1 野生株（WT）を植菌した三電極系一槽式 bioelectrochemical system（BES、作用極電位 +0.3 V vs Ag/AgCl）に水素を添加した結果、水素に依存した電流生成が確認され、MR-1 株は水素を電子源として電流を生産できることが示された。次に 2 つのヒドロゲナーゼの水素酸化への寄与を調べるため、*hyaB* と *hydA* の遺伝子破壊株（*ΔhyaB* と *ΔhydA*）を作成し、それぞれの電流生産を調べた。その結果、*ΔhydA* 株では水素添加に依存した電流が生産されたが、*ΔhyaB* 株では電流生産がみられなかった。これは、HyaB が水素酸化による電流生産に必要なヒドロゲナーゼであることを示している。次に水素酸化によって MR-1 株がエネルギーを獲得できるかを調べるため、水素と乳酸（炭素源）が共存する条件における菌体収率（乳酸分解量あたりの菌体増加量）を測定した。三電極系一槽式 BES では電流生成に伴って対極から水素が発生するため、運転中に槽内に水素が蓄積する。乳酸を基質として WT の電流を測定した結果、クーロン効率（乳酸から電流への変換効率）が 100%を超え、乳酸以外に対極から発生した水素も電子源として利用していることが示された。一方 *ΔhyaB* 株を用いて同様の測定を行った結果、WT と比べてクーロン効率が約 50%、菌体収率が約 30%低下した。この結果から、MR-1 株は水素と電極を利用して増殖に必要なエネルギーを獲得できることが明らかとなり、水素から電極へ電子を伝達する過程でプロトン濃度勾配を形成し、ATPase を駆動できることが示唆された。水素と炭素源が存在する場合、MR-1 株は水素酸化で ATP を合成し、炭素源を効率的に同化できると考えられる。今後は水素酸化によるエネルギー獲得経路についてさらに詳細な解析を行う予定である。

*Shewanella oneidensis* MR-1, bioelectrochemical system, hydrogen metabolism

発表責任者：廣瀬 篤弥（s116188@toyaku.ac.jp）

講演番号：3J27p06
講演日時：3 月 19 日 15:25～ J 校舎 27 会場

# 標準型 NiFe ヒドロゲナーゼと酸化還元ポリマーによる両方向触媒反応系の構築

# Construction of bidirectional catalytic reaction system composed of standard-type [NiFe]-hydrogenase and redox polymer

○白岩 咲衣子、北隅 優希、白井 理、加納 健司 (京大院農)
○Saeko SHIRAIWA, Yuki KITAZUMI, Osamu SHIRAI, Kenji KANO (Kyoto Univ.)

【目的】

近年，環境保全や省エネルギーを実現するため，水素の利用が推進されている．水素を基質としたバイオ燃料電池や水素生成バイオリアクターには，水素酸化還元酵素“ヒドロゲナーゼ”が生体触媒として用いられる．その中でも，[NiFe]-ヒドロゲナーゼは活性が高く，産業利用に適している．また，本酵素は酸素や電極電位などの酸化的ストレスにより不活性化状態をとるが，酸化還元ポリマーによって周囲の酸化還元状態を制御すると，不活性化を回避できることが知られている．酸化還元ポリマーは電極上への固定化が容易な材料であり，酵素 - 電極間の電子伝達を仲介するメディエータとして働く．本研究では，*Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F 由来の標準型[NiFe]-ヒドロゲナーゼ($H_2$ase)に着目し，酸化還元ポリマーと組み合わせた両方向触媒反応系の構築を目指した．

【方法】

チオール，またはグルタルアルデヒドを用いて $H_2$ase を金電極上に固定化した．本電極を作用極とし，電気化学測定を行った．メディエータとしてベンジルビオロゲン (BV) を測定溶液中に添加した．一方，酸化還元ポリマーであるビオロゲンポリマー (VP) と $H_2$ase をグラッシーカーボン電極またはカーボンフェルト上に固定化し，電気化学測定を行った．

【結果と考察】

まず，本酵素を電極上に固定化し，BV をメディエータとしたメディエータ型電子移動(MET)型反応系における酵素の活性化状態の変化について酵素触媒電流を指標として検討した．$H_2$ase 固定電極において，BV を溶液中に添加するとプロトン還元に由来する触媒電流が観測され，触媒電流は時間とともに増大した．本実験系では，触媒電流値の増加は有効酵素濃度の増加に対応する．したがって，本結果は，大気雰囲気下で酸化的不活性化されていた Ni－A 型酵素が，電極近傍で生成した還元型 BV によって，再活性化されたと考えられる．つまり，この方法は非常に有用な電気化学的活性化法となり得る．

次に，酸化還元ポリマーと本酵素の両方を電極上に固定化し，電気化学測定を行った．測定溶液の pH が高くなるに伴い，プロトン還元から水素酸化へ移行する触媒電流を確認した．さらに，比表面積の大きいカーボンフェルトを電極材料とすることで，18 mA $cm^{-2}$ ほどの高い電流密度でのバイオ電解を実現した．

Hydrogenase, Bioelectrocatalysis, Bidirectional catalytic reaction

講演番号：3J27p07
講演日時：3 月 19 日 15:40～ J 校舎 27 会場

# $H_2$/air($O_2$) biofuel cell based on gas diffusion system

○Hongqi XIA, Keisei SO, Yuki KITAZUMI, Osamu SHIRAI, Kenji KANO (Kyoto Univ.)

Enzymatic biofuel cells (EBFCs) are energy-conversion devices in which redox enzymes are utilized as electrocatalysts. Thanks to substrate specificity and high catalytic efficiency under mild conditions (e.g., room temperature, around neutral pH), EBFCs are expected to be one of the next-generation energy conversion systems, comparable to conventional fuel cells, for example polymer fuel cells, in which the noble metals are often used as catalysts and operated in acidic or alkaline electrolyte. However, most of the EBFCs reported in the literature exhibited low power density due to low interfacial electron-transfer rate between enzyme and electrode and slow mass-transfer of fuel. Such limited performances seem to hinder technological application.

In principle, a variety of compounds, such as sugar, alcohol, formate and dihydrogen ($H_2$), can be utilized as fuels of EBFCs. Among them, $H_2$/$O_2$ biofuel cells wherein $H_2$ is oxidized by hydrogenase at the bioanode and $O_2$ is reduced by multi-copper oxidases (MCOs) at the biocathode are known as clean and highly efficient energy conversion devices that have attracted increasing attention for establishing a “hydrogen economy”.

In this work, an $O_2$-sensitive [NiFe]-hydrogenase from *D. vulgaris* Miyazaki F ($H_2$ase) and bilirubin oxidase, one of the MCOs, from *M. verrucaria* (BOD) are used as biocatalysts for $H_2$ oxidation and $O_2$ reduction, respectively, and ketjen black-modified water proof carbon paper (KB/WPCC) was used as an electrode material. A gas-diffusion system was employed to minimize mass-transfer limitation of $O_2$ and $H_2$ gases and to suppress the oxidative inactivation of $H_2$ase at high electrode potentials. As result, a power density of 8.4 mW $cm^{-2}$ dual gas-diffusion $H_2$/$O_2$ biofuel cell is constructed with a substrate-modified biocathode at 40 °C. On the other hand, based on the electrostatic interaction between enzyme (BOD or $H_2$ase) and specially functionalized electrode surfaces, enhanced biocathode and bioanode have been developed to improve the productive orientation for fast interfacial electron transfer. Finally, an improved dual gas-diffusion membrane- and mediatorless $H_2$/air-breathing biofuel cell is reported under room temperature with a power density of 6.1 mW $cm^{-2}$. The performance of our biofuel cell is 5.6 times (40 °C with pure $O_2$) and 4 times (room temperature with air) better than that of the best $H_2$/$O_2$ biofuel cell (60 °C with pure $O_2$).

biofuel cell, bioelectrocatalysis, gas diffusion

発表責任者：加納健司（kano.kenji.5z@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3J27p08
講演日時：3 月 19 日 15:55～ J 校舎 27 会場

# 気相の二酸化炭素を直接還元する新奇バイオカソードの構築

# Efficient bioelectrocatalytic $CO_2$ reduction on gas-diffusion-type biocathode with tungsten-containing formate dehydrogenase

○阪井 研人[1]、北隅 優希[1]、白井 理[1]、高木 一好[2]、加納 健司[1] ([1]京大院農、[2]立命館大)
○Kento SAKAI[1], Yuki KITAZUMI[1], Osamu SHIRAI[1], Kazuyoshi TAKAGI[2], Kenji KANO[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Ritsumeikan Univ.)

【目的】

低炭素社会に向けて，二酸化炭素（$CO_2$）を資源化する技術の革新は喫緊の課題であり，$CO_2$ の有用化合物への還元的変換は，期待されている方法のひとつである．特に二電子還元生成物であるギ酸はその貯留性と，燃料や有用化合物への変換出発原料としての優位性から注目されている．しかし，ギ酸/$CO_2$ 対の電解による酸化還元反応はエネルギーロスを生みやすく，本反応を効率良く行うための触媒開発は必須である．近年，穏和条件下で高い触媒能・選択性を持つ触媒である酵素が注目を集めている．我々は，*Methylobacterium extorquens* AM1 由来の $NAD^+$依存型ギ酸脱水素酵素（FoDH1）に着目している．本酵素反応は低分子酸化還元物質（メディエータ）を仲介させ電極反応と共役でき，逆反応である $CO_2$ からギ酸への還元も触媒できる．一方，酵素を用いた $CO_2$ 還元デバイスの実用化には高い電解電流密度が要求されるが，溶液反応では，$CO_2$ の低い溶解度や不安定性の影響が懸念される．本研究では，気相/液相/固相のバイオ三相界面を有するガス拡散型電極を利用することにより，それらの課題を克服した高効率 $CO_2$ バイオ電解法の構築を目指した．

【方法】

メディエータとして，1,1’-trimethylene-2,2’-bipyridunium dibromide（TQ）を合成した．多孔質炭素材料であるケッチェンブラック（KB）とフッ素樹脂を混合したガス拡散型電極を作製した．この電極表面に FoDH1 を吸着させ，酵素機能電極を作製し，電気化学測定を行った．

【結果と考察】

TQ をメディエータとした時，溶液中での $CO_2$ 還元触媒電流は–0.22 mA $cm^{-2}$ だった．このとき，触媒電流電圧曲線から求まる半波電位は基質の電位より 0.1 V だけ負であり，低過電圧での $CO_2$ バイオ電解を達成したと判断した．次に，作製したガス拡散型電極を用いて気相から $CO_2$ を供給したところ，$CO_2$ 還元触媒電流は–18 mA $cm^{-2}$ に達した．この時，ギ酸生成速度は 0.1 μmol $cm^{-2}$ $s^{-1}$ だった．一方，本電極は，フッ素樹脂含量の割合によって，電極の疎水性/親水性を調整できる．フッ素樹脂含量の最適化を行ったところ，KB とフッ素樹脂の重量比が 8 : 2 の条件で最も高い電解電流密度を示した．フッ素樹脂含量が高くなると，疎水性が高くなり，酵素反応場が形成されにくくなることが考えられる．このような気相の $CO_2$ を直接還元するバイオ電解は，世界初の試みであり，クリーンなエネルギー社会の実現への大きなブレイクスルーとなる．

$CO_2$ reduction, Formate dehydrogenase, Bioelectrocatalysis

発表責任者：阪井研人（sakai.kento.68e@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3J27p09
講演日時：3 月 19 日 16:10～ J 校舎 27 会場

# 究極の微小電極型アンペロメトリックグルコースバイオセンサの追求
# Proposal of ultimate amperometric biosensors with microelectrodes

○松井 由紀菜、北隅 優希、白井 理、加納 健司（京大院農）
○Yukina MATSUI, Yuki KITAZUMI, Osamu SHIRAI, Kenji KANO (Kyoto Univ.)

【目的】

アンペロメトリックバイオセンサの理想的な特性として，電流応答($i_{lim}$)が測定時間や酵素活性の変動に依存しないことが挙げられる．アンペロメトリックバイオセンサの反応過程を，基質の拡散，膜透過，酵素電極反応の三段階の直列反応とすると$i_{lim}$は次のように表される．

$$1/i_{lim} = 1/i_k + 1/i_p + 1/i_d$$

ここで，$i_k$：酵素触媒電極反応律速電流，$i_p$：膜透過律速電流，$i_d$：基質拡散律速律速電流である．この中で最も小さい電流を与える過程が律速段階(rds)である．$i_k$は酵素活性の変動をそのまま反映するので，その過程が rds となることは好ましくない．この問題は酵素活性を十分大きくすることで回避できる．また，多くのバイオセンサにおいて$i_p$の過程を rds として定常電流を得ているが，電極間のばらつきが大きくなる要因になる．したがって，膜透過性も十分高いことが望ましい．基質の物性のみで決まる$i_d$は変動要因を持たないため本質的に安定しており、究極的には$i_{lim} = i_d$を実現することが理想的である．直径数 mm の平板電極では，物質拡散が線形拡散となるため静止溶液中で$i_d$は時間と共に減少するため複雑であり，簡便なセンサーとして実用的でない．この問題を解決するため，本研究では微小電極を用いて，$i_{lim} = i_d$を実現できる究極のアンペロメトリックバイオセンサとしての条件検討とデジタルシミュレーションを用いた検討を行うことで，FAD 依存型グルコースデヒドロゲナーゼ(FAD-GDH)を用いたグルコースセンサを構築した．

【方法】

0.06 mM FAD-DGH および 0.2 mM メディエータを含むリン酸緩衝液(pH7) にグルコースを添加し，三電極式でサイクリックボルタモグラムを記録した．作用電極には直径 100 μm の微小電極を用いた．電極上への酵素の固定化には，架橋剤としてグルタールアルデヒドを用いた．

【結果と考察】

微小電極で記録したメディエータのボルタモグラムは静止溶液中で迅速に定常電流に達しシグモイド型となった．高濃度の FAD-GDH を用いた触媒反応と共役させたところ，$i_{lim}$は基質濃度$c_S$に比例し，その定量範囲は$n_S c_S > n_M c_M$（$c_M$：メディエータ濃度)まで広がった．このことは$i_{lim} \approx i_d$が実現できたことを示す．デジタルシミュレーションでは，基質の還元当量が電極近傍で酵素反応によりほぼ完全にメディエータのそれに変換され，一種の反応面を形成し，その反応面と電極の距離が$c_S$の増加により短くなることが示された．しかし，$c_S$がさらに大きくなると$i_{lim}$は頭打ちとなった．シミュレーションの結果によると、これは$i_d$が大きくなり$i_k$の効果が表れるようになったことを反映している．そこで，酵素を電極上に固定化し電極近傍の酵素濃度を極限まで高めることで，検量線の線形領域をメディエータ濃度の 20 倍である 5 mM まで拡大することに成功した．

electrochemical glucose sensor, bioelectrocatalysis, microelectrode

講演番号：3J27p10
講演日時：3 月 19 日 16:25～ J 校舎 27 会場

# 電気を還元力とした鉄酸化細菌による二酸化炭素からの有用物質生産

# Electrochemical conversion of $CO_2$ by *Acidithiobacillus ferrooxidans*

○平野 伸一、長岡 亨、松本 伯夫（電中研）
○Shin-ichi HIRANO, Toru NAGAOKA, Norio Matsumoto (CRIEPI)

【背景及び目的】

産業活動によって排出される $CO_2$ は温暖化効果ガスとして気候変動を引き起こす要因となるため、その削減が重要な課題となっている。近年、$CO_2$ を原料とした化学原料やアルコールなど有価物に変換する様々な技術の開発が低炭素・循環型社会の構築に向けて進められている。$CO_2$ を高分子の有価物に変換するためには外部からエネルギー(還元力) の投入が必須である。これまで、$CO_2$ 変換反応の還元力として光や水素を用いた研究が多くなされている（化学触媒、微細藻類など）が、光利用には膨大な受光面積の確保、日内・季節間変動の問題、水素利用には保存・輸送の問題が存在する。一方、これまでに、我々の研究グループでは電気化学的に電子を還元力として供給しながら培養する電気培養法の開発を進めており、独立栄養生物である鉄酸化細菌に本法を適用することにより、電気で増殖をサポートし、通常の培養法に比べ最終菌体密度を 10-100 倍程度向上可能であることを明らかにしている。そこで、本研究では、鉄酸化細菌の遺伝子組換えにより有価物生産能を付与・強化することにより、電気を還元力とする $CO_2$ 変換技術の構築を目的とした。

【方法及び結果】

鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC19859 を本研究の対象とし、遺伝子組換えにより乳酸生産能を強化することを試みた。*A. ferrooxidans* に対してコドンを最適化した *Lactococcus lactis* 由来の lactate dehydrogenase 遺伝子を大腸菌を介した接合伝達により *A. ferrooxidans* に導入した。導入遺伝子の確認後、三極式の電気培養槽 (200 ml 容) を用いて遺伝子組換え *A. ferrooxidans* および野性株の電気培養を実施した。培地としては電子メディエーターである硫酸鉄を含む 9K 培地 (pH2.0) を使用し、空気をバブリングしながら培養を開始し、約 24 時間後、対数増殖期に還元電位 (+0V vs Ag/AgCl) を作用電極に印加した。培養期間中は-2.0 mA/cm$^2$ 程度の電流が検出され、作用極から *A. ferrooxidans* に電子が供給されていることが確認された。電位印加後、培養を 1 週間継続し、定期的に *A. ferrooxidans* の菌体密度と菌体内ならびに培養液中の代謝産物分析を行った。その結果、野性株、遺伝子組換え株ともに、通電時において非通電時と比べて最終到達菌体密度は約 10 倍向上し、遺伝子組換え株では野性株では見られない乳酸とその他数種の代謝産物の蓄積が検出された。本発表では投入した還元力・産物のバランスを踏まえ $CO_2$ 変換技術としての本法の有用性を議論したい。本研究は科研費 挑戦的萌芽研究「電気駆動型新規二酸化炭素変換プロセスの構築」の一部として実施された。

$CO_2$, Chemolithotrophic, Electrochemical cultivation

発表責任者：平野 伸一（s-hirano@criepi.denken.or.jp）

講演番号：3J27p11
講演日時：3 月 19 日 16:50～ J 校舎 27 会場

# 無機/生体ハイブリッド光触媒を用いた水分解による水素生成

# Hydrogen formation by water splitting using the inorganic photo/biocatalyst hybrid

○本田 裕樹[1]、渡邊 源規[1]、萩原 英久[1,2]、伊田 進太郎[1,2]、石原 達己[1,2] ([1]九大 WPI-I2CNER、[2]九大工)
○Yuki HONDA[1], Motonori WATANABE[1], Hidehisa HAGIWARA[1,2], Shintaro IDA[1,2], Tatsumi ISHIHARA[1,2] ([1]WPI-I2CNER, Kyushu Univ., [2]Kyushu Univ.)

【目的】光触媒を用いた水分解による水素生成は、水素エネルギー社会の実現に向け重要な課題であり、高効率で安価な光触媒の開発が求められている。演者らは、光触媒としての無機半導体と、高い水素生成能を示す[FeFe]-ヒドロゲナーゼの反応(EC 1.12.7.2)を組み合わせた無機/生体ハイブリッド光触媒反応系による水素生産系に注目してきた。特に、精製酵素と比べて取り扱いが容易な組換え大腸菌の菌体反応を直接、無機半導体とのハイブリッド反応系に供する手法を考案し、酸化チタンによる電子メディエータ(メチルビオロゲン、MV)の光触媒的還元(反応①)および還元型 MV を電子源とした組換え大腸菌による水素生成(反応②)の２つの反応を組み合わせた光触媒水素生産系を構築した(参考文献１)。本講演では、反応①の高効率化による反応系全体(反応①＋反応②)の光触媒水素生産能の向上、反応①および反応②それぞれの光エネルギーの変換効率について報告する。
【方法および結果】反応①は、各種無機半導体粉末(10 mg)と反応溶液(3 ml)、MV(5 mM)を混合し、$N_2$ バブリングの後に所定の時間光照射(300 W Xe ランプ)することで実施し、還元型 MV の呈色を指標に反応の進行を評価した。反応②では、*Clostridium acetobutylicum* NBRC 13948 由来[FeFe]-ヒドロゲナーゼおよび修飾酵素遺伝子を挿入したプラスミドを保持する大腸菌を所定の方法で培養後、嫌気条件下で発現誘導し、得られた菌体を生体触媒として用いた。反応①＋反応②では、無機半導体(50 mg)、反応溶液(20 ml)、5 mM MV、組換え大腸菌(0.1 g-wet cell)の混合液に対して光照射し、水素生成量を GC 分析した。まず、反応①の高効率化を目指して種々の条件を検討した。酸化チタン P-25 と特定の反応溶液を用いた際、従来(参考文献 1)と比較して MV 還元速度が 300 倍以上に向上した。改善した反応①において、MV 還元に対する見かけの量子収率(AQY=100×還元 MV 分子数/照射フォトン数)は、300 nm 単色光に対して $AQY_{300}$＝61%、350 nm 単色光に対して $AQY_{350}$＝52%であった。次に、反応②の効率を検討するため、化学的に還元された MV を用いて、所定の反応時間後の供与還元型 MV 量に対する水素生成量を検討した。供与還元 MV が 5 mM までは生成水素量は理論値と同等の値を示し、菌体反応はほぼ 100%の効率で還元型 MV を水素生成に使用することが示された。最後に、改善した反応①＋反応②による水素生成を試験した。見かけの量子収率(AQY=100×2×生成水素分子数/照射フォトン数)は、$AQY_{300}$＝26%、$AQY_{350}$＝31%に達し、従来の効率($AQY_{300}$＝0.3%)から大幅に向上することが分かった。

（参考文献１）Y. Honda, H. Hagiwara, S. Ida, T. Ishihara, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2016, 55, 8045-8048.

hydrogenase, photocatalyst, whole cell reaction

講演番号：3J27p12
講演日時：3 月 19 日 17:05～ J 校舎 27 会場

*Clostridium paraputrificum* の乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子破壊による水素ガス生産増強
Enhancement of hydrogen gas production of *Clostridium paraputrificum* by disruption of the lactate dehydrogenase gene

吉田 稜、粟冠 真紀子、○木村 哲哉、粟冠 和郎（三重大生資）
Ryo Yoshida, Makiko Sakka, ○Tetsuya Kimura, Kazuo Sakka (Mie Univ.)

次世代クリーンエネルギーとして注目されている水素ガスをバイオマスから微生物によって直接生産することを究極の目的として,キャンパス土壌から単離した嫌気性細菌 *Clostridium paraputrificum* M21 を中心としたシステムの構築をめざしている。嫌気性細菌が糖を代謝する経路は,解糖系を経てピルビン酸までは好気性菌と同じ代謝経路を経るが, ピルビン酸からアセチル CoA への代謝で水素ガスが生産され,さらに酢酸や酪酸が生産される嫌気性細菌特有の代謝が行われる。さらに,生じた還元力も水素ガスの生産に用いられる。そこで, ピルビン酸以降の流れを増やす代謝へ変化をさせることで水素ガス生産を向上させるため, ピルビン酸から乳酸生産に働く乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を破壊することで,ピルビン酸からアセチル CoA への流れを強化することを計画した。*C. paraputrificum* M21 のゲノム解析と発現解析より乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子には *LDH2381* と *LDH3306* の 2 種類があり,*LDH2381* の発現量が非常に高いことが分かった。そこで *LDH2381* を遺伝子破壊のターゲットに選択し,近年 *Clostridium* 属の遺伝子破壊に広く利用されている ClosTron プラスミドを利用した。この手法では,ベクターから逆転写されたグループⅡイントロンがターゲット遺伝子に挿入されることにより遺伝子が破壊される。本研究では,ClosTron ベクターpMTL007C-E2 にリコンビナント PCR によって *LDH2381* 破壊用に改変したカセットを挿入し,*C. paraputrificum* M21 にエレクトロポレーションにより形質転換した。グループⅡイントロン中のエリスロマイシン耐性遺伝子の活性化によって遺伝子破壊株を選抜した。さらにグループⅡイントロンが挿入されていることを PCR 法で確認した。

*C. paraputrificum* M21 の *LDH2381* 破壊株を 100mL の GS 改変培地でグルコースを炭素源として嫌気培養瓶で培養した結果,乳酸がほとんど生産されず,酢酸や酪酸の生産が増加した。これは、LDH が破壊されることでピルビン酸からアセチル CoA への流れが増加したことを示している。その結果、水素ガス生産量が非破壊株のおよそ 3.5 倍に増加し、グルコース 1 モル当たり 1.0 モルの水素ガスが生産された。また、本菌は培地に鉄イオンを加えることで水素ガス生産が増加することがわかっているが、鉄を添加した GS 改変培地では、非破壊株に対して 42 パーセント水素ガスの生産が増加し、グルコース 1 モルあたり 1.3 モルの水素ガスが生産された。さらにジャーファメンターで 500mL の培養にスケールアップしたところ、グルコース 1 モルあたり 1.8 モルの水素ガスが生産された。

*Clostridium paraputrificum*, hydrogen gas, lactate dehydrogenase

発表責任者：木村哲哉（t-kimura@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：3J27p13
講演日時：3 月 19 日 17:20～ J 校舎 27 会場

嫌気性汚泥から分離した *Clostridium* 属細菌の水素発酵能の評価
Evaluation of hydrogen fermentation ability of *Clostridium* sp. isolated from anaerobic sludge
○若井 祐樹、大西 章博、藤本 尚志、鈴木 昌治 (東農大)
○Yuki WAKAI, Akihiro OHNISHI, Naoshi Fujimoto, Masaharu SUZUKI (Tokyo Univ. Agric.)

【背景と目的】水素は次世代のエネルギー媒体として期待されており、その安価な製造方法として嫌気性細菌を用いた水素発酵法が注目されている。水素発酵の研究で主に用いられている *Clostiridium* 属は、グルコースやデンプン等の糖類から高効率で水素生成可能である。しかしながら、雑菌汚染に脆弱であることや直接利用できない基質があることから、これらを補う微生物の探索が求められている。そこで本研究では、新規の水素発酵微生物の探索と機能解析を試みる。今回は、二相式メタン発酵システムの嫌気性汚泥から分離した 2 株の系統学的位置と水素発酵特性について評価した結果について報告する。
【実験材料と方法】ヒートショック処理をした嫌気性汚泥を水素発酵用培地に接種して 37℃で振盪培養した。培養後のガス生成量と水素濃度を測定し、水素生成が認められた培養物を分離用平板培地(Difco™ Columbia Broth 3.5%、ANAEROBE BASAL BROTH 3.54%、寒天 2.0%、pH 無調整)を用いた希釈平板培養法に供した。次に、DS 株と BW1 株および対照株として *Clostridium butyricum* IAM14194$^{T}$ 株を用いて、個々の基質に対する水素生成能を評価した。水素発酵試験用には、YNB 改変培地(Difco™ Yeast Nitrogen Base 10%、Bacto™ Proteose Peptone NO,3 0.5%、酵母エキス 0.5%、炭素源 1.0%、pH7.0)を用いた。炭素源には単糖類 6 種類、二糖類 5 種類、その他に核酸やアミノ酸など 18 種類の基質を試験に用いた。125 ml 容バイアル瓶に YNB 改変培地 50 ml を充填し、気相部を窒素置換して密封後、オートクレーブ滅菌して実験に用いた。前培養した供試菌株を、菌体濃度として $OD_{660}$ がおよそ 0.1 となるように接種し、48 時間、37℃、90 rpm で振盪培養した。培養後に水素生成量、濁度、pH を測定した。
【結果及び考察】水素生成が確認された発酵物から、DS 株と BW1 株の 2 菌株を純粋分離した。これらの 16S rRNA 遺伝子の全長を解析した結果、最も相同性の高かった既知菌種は *Clostridium putrefaciens*(約 96%)であった。DS 株と BW1 株は *Clostridium* に属する新規の細菌であるものと考えられた。2 つの被験株の水素生成能は、大部分の発酵基質で対照株よりも低い値を示した。しかし、α-ケト酪酸を炭素源とした場合の水素生成量は、2 つの被験株で約 61.5 ml、対照株で 32.7 ml で、被検株は対照株の約 2 倍の値を示した。同様に、ウリジル酸を炭素源とした場合の水素生成量は、2 つの被験株で約 53.0 ml、対照株で 18.3 ml で、被検株は対照株の約 3 倍の値を示した。

hydrogen fermentation, *Clostridium*, biomass

講演番号：3J27p14
講演日時：3 月 19 日 17:35～ J 校舎 27 会場

*Megasphaera elsdenii* の水素生産特性と乳酸発酵を利用した水素生産システムの可能性
Hydrogen Fermentation Characteristics of *Megasphaera elsdenii* and Hydrogen Fermentation System using Lactic Acid Fermentation
○小林 邑弥、大西 章博、藤本 尚志、鈴木 昌治（東農大）
○Satomi KOBAYASHI, Akihiro OHNISHI, Naoshi FUJIMOTO, Masaharu SUZUKI (Tokyo Univ.Agric)

【背景と目的】
水素は次世代のエネルギー媒体として期待されており、その安価な製造方法として嫌気性細菌を用いた水素発酵法が注目されている。水素発酵の研究で主に用いられている *Clostridium* 属は、グルコースやデンプン等の糖類から高効率で水素生成するものの、雑菌汚染には脆弱であり、乳酸菌の共存下では著しく水素生成能力が低下することが報告されている。そのため、安定した水素発酵において基質や植種の熱処理が不可欠であるが、熱処理によるエネルギー投入は、得られる水素の燃料としての価値を低下させる要因となっている。この打開策として我々は、乳酸菌共存下でも安定して水素を生成する *Megasphaera elsdenii* を LU-HPB（Lactate Utilizing-Hydrogen Producing Bacteria）として提案した（*RSC Adv.*.2012,2, 8332）。*M. elsdenii* は乳酸を基質に収率 0.4～0.8mol-$H_2$/mol-lactate で水素生産を行うことが可能である。本研究では *M. elsdenii* の水素発酵能を評価し、実用化に向けた応用技術の開発を試みる。本報では、*M. elsdenii* の水素発酵特性と乳酸菌を利用した水素発酵システムの可能性について検討した結果を報告する。

【方法及び結果】
まず、*M. elsdenii* の 15 種類の糖類の発酵特性を評価した。比較対象菌には一般的な水素発酵菌である *Clostridium butyricum* を用いた。125ml 容バイアル瓶に人工培地 25ml を充填し窒素置換して密封後、滅菌して実験に用いた。*C. butyricum* はソルビトール、ラムノース、マンニトールを除く 12 の糖類で水素生成を示した。*M. elsdenii* はグルコース（21ml）、フルクトース（34ml）、マンニトール（21ml）、マルトース（16ml）の 4 つの糖類で水素生成を示したものの、その他の 11 種類の糖類では水素生成を示さなかった。*M. elsdenii* は *C. butyricum* に比べて、水素発酵に直接利用できる糖類が限られていることが示された。次に、乳酸菌との共培養下における水素生産システムについて検討した。*M. elsdenii* と *C. butyricum* が直接利用できないソルビトール又はラムノースを糖類とした場合、*C. butyricum* では明確な水素生成は示さなかった。これに対し、*M. elsdenii* は乳酸菌との共培養によりソルビトールで 15ml、ラムノースで 9ml の水素生成を示した。このように *M. elsdenii* は *C. butyricum* に比べて直接発酵可能な糖類は限られているものの、乳酸菌による乳酸発酵を経ることで、直接利用できない糖類から水素生産可能であることが示された。

*Megasphaera elsdenii*, Hydrogen fermentation, Lactate

講演番号：3J27p15
講演日時：3 月 19 日 17:50～ J 校舎 27 会場

# メタン発酵による生分解性プラスチックの分解特性
# Decomposition Characteristics of Biodegradable Plastic by Anaerobic Digestion

○曽 厚嘉、大西 章博、藤本 尚志、鈴木 昌治（東農大）
○Hou Chia TSENG, Akihiro OHNISHI, Naoshi FUJIMOTO, Masaharu SUZUKI (Tokyo Univ. Agric.)

【背景と目的】事業系の食品ロスは 300~400 万トン/年発生しており、大部分が焼却・埋立処分されている。賞味期限を過ぎた日配品やごみ袋で回収された食品廃棄物を生分解処理する場合は、破砕機で破砕するなどして、容器包装類やごみ袋を分別除去する必要がある。分別過程で除けなかった容器包装類やごみ袋は生分解処理過程の配管や機械の閉塞、故障の原因となる。現在、これらの容器包装類やごみ袋をポリ乳酸を原料とした生分解性プラスチックに置き換えようとする社会的な動きがある。このことは分別除去の手間や機械的トラブルを解消し、廃棄物の生物処理促進に寄与するものと考えられる。しかしながら、生分解性プラスチックの生分解過程における生物学的な知見は少なく、実用性の見込みについては不透明である。そこで本研究ではメタン発酵による生分解性プラスチックの分解特性と、生物学的な側面について解析を試みる。

【実験材料と方法】実験材料には、稼働中の高温メタン発酵装置（55℃）の嫌気性汚泥と、Corbion 社提供の PLLA（ポリ L 乳酸）ペレットと PLLA で生産した PLA 製品（スプーンやカップなど）を用いた。分解実験は 125ml もしくは 1.2L 容バイアル瓶に PLLA ペレットまたは PLA 製品および嫌気性汚泥を投入し、窒素置換して 55℃で行った。分解実験過程で発生したバイオガスを回収し、ガス生成量、ガス組成を測定した。また、PLLA ペレットおよび PLA 製品の乾燥重量から分解率とメタン収率を求めた。微生物相の解析は分解実験後の汚泥から DNA を抽出して、PCR-DGGE 法によって行った。

【結果及び考察】PLLA ペレットを添加した分解実験では、約 100 日間の分解実験過程で継続的にメタンガスを生成した。PLLA ペレット無添加の対照実験では 25 日程度でメタンガスの生成が停止した。PLLA ペレット 3g を添加した実験では 800ml 程度のメタンガスが生成し、対照実験では 120ml 程度であった。この時の PLLA ペレット分解率は 70%以上で、メタン収率は約 300ml/g-PLLA consumption であった。この結果は、PLA 製品を用いた実験でも同様であった。これらのことから、PLLA ペレットはメタン発酵プロセスで分解可能であることが示された。また、分解実験後の嫌気性汚泥を構成する微生物相には変化があり、生分解性プラスチックの分解に寄与する微生物の存在が示唆された。

Biodegradable plastic, Methane fermentation, PCR-DGGE

講演番号：3J27p16
講演日時：3 月 19 日 18:05～ J 校舎 27 会場

導電性ナノ粒子カーボンブラックがメタン発酵へ与える影響の解明
Effects of carbon black on anaerobic digestion
○藤縄 和輝[1]、高妻 篤史[1]、上野 嘉之[2]、渡邊 一哉[1]([1]東薬大生命、[2]鹿島技術研究所)
○Kazuki FUJINAWA[1], Atushi KOUZUMA[1], Yoshiyuki UENO[2], Kazuya WATANABE[1] ([1]Tokyo Univ. Pharm. Life Sci., [2]Kajima Tech. Res. Inst.)

[背景・目的]
メタン発酵とは、微生物が有機物を分解し、最終産物としてメタンと二酸化炭素を生成する異化代謝プロセスである。メタン発酵を用いた嫌気消化槽は、家畜排泄物や下水汚泥などの有機性廃棄物の処理、およびそれらからのエネルギー回収のために幅広く利用されている。しかし、メタン発酵は好気的処理等と比較して処理速度が遅く、また安定した処理が難しいなどの課題がある。近年、この解決策の一つとして、導電性微粒子の添加が注目を集めている。導電性微粒子を電子伝達物質または電子受容体として利用することで微生物の代謝が促進され、メタン発酵が促進されることが報告されている。一方、ある種の導電性微粒子が微生物に対して毒性を示すことも報告されており、これらが微生物の代謝に与える影響に関しては未だ不明な点が多い。そこで本研究では、導電性微粒子であるカーボンブラック（CB、炭素でできた導電性ナノ粒子）がメタン発酵へ与える影響を調査した。
[方法・結果]
用いた CB は粒径約 30 nm の炭素粒子であり、ゴムに導電性を与えるためなどに用いられている。この CB を嫌気消化汚泥液に添加し、グルコースを基質とするバッチ式中温メタン発酵におけるバイオガス生成量と有機酸蓄積量を測定した。その結果、CB を 0.004%（w/v）添加するとメタン生成が著しく減少し、さらに添加量を 0.02%に増やすとほとんどメタンが生成されなくなった。この結果より、CB はメタン発酵微生物群に対する阻害活性を持つことが示された。一方 CB 添加系でもグルコースは消費され、その際に酢酸が蓄積していた。そこで定量 PCR を行ったところ、CB 添加によりアーキアは著しく減少するが、バクテリア量はあまり変わらないことが示された。CB 存在下で酸発酵を行っていた菌叢を調べるために 16S rRNA 遺伝子を用いた分子生態解析を行ったところ、CB 添加系では *Clostridiale* が優占化しており、その中でも *Clostridium butyricum* の近縁種が大多数を占めることが示された。*Clostridium butyricum* は酸発酵菌の一種であるがシトクロムを持ち、この近縁種は細胞外電子伝達（微生物燃料電池における発電）を行うことが報告されている。よって、細胞外電子伝達能をもつ酸発酵菌が CB 存在下で酸発酵を行うと考えられる。以上の結果は、メタン菌やホモ酢酸菌による酢酸代謝が CB により阻害され、その結果としてメタン生成が抑制されることを示唆している。今後は、CB 添加による酢酸代謝阻害の機構を分子レベルで解明するため、酢酸資化性メタン菌などを使った研究を行う予定である。

Anaerobic digestion, Nanomaterial, Microbial community

発表責任者：藤縄和輝（s126161@toyaku.ac.jp）

講演番号：3J28a02
講演日時：3 月 19 日 09:35～ J 校舎 28 会場

CRISPR/Cas9 system を用いたオウレンのゲノム編集
Genome editing in *Coptis japonica* using CRISPR/Cas9 system
○浜 竜哉、西尾 洋、山田 泰之、佐藤 文彦（京大院・生命科学）
○Ryuya HAMA, Hiroshi NISHIO, Yasuyuki YAMADA, Fumihiko SATO (Kyoto Univ.)

部位特異的なゲノム改変技術、いわゆるゲノム編集に用いる技術として、近年 CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat)/Cas9 システムが注目を集めている。このシステムではguideRNAによって誘導されるCas 9 が標的配列を配列特異的に切断することにより遺伝子の欠損、挿入が引き起こされ、標的配列を比較的任意に設定できるために多様な遺伝子改変が可能である。ゲノム編集技術の植物への応用は従来の遺伝子組換え技術の壁を越えた新しい植物育種法として、その規制の問題も含め議論が行われている。現在、この技術はシロイヌナズナ、タバコといったモデル植物を含め様々な植物種において研究が進められているが、有用二次代謝産生植物種への適用例は少ない。そこで、我々は、非モデル植物に対するゲノム編集技術利用の有用性に着目し、イソキノリンアルカロイドを産生する薬用植物、オウレン(*Coptis japonica*)を実験材料にゲノム編集技術の応用可能性を検討した。guideRNA 発現にはPolⅢにより転写されるU6プロモーターが用いられているが、この発現には種特異性が報告されており、シロイヌナズナの U6 プロモーターを用いた場合では、変異導入が確認できなかった。そこで、オウレンの近縁種であるハナビシソウ(*Eschscholzia californica*)ゲノム配列からU6プロモーターを得て、gRNA 発現コンストラクトを作製した結果、オウレンプロトプラストを用いた一過的発現系でのCRISPR/Cas9システムによる目的遺伝子への変異の導入を確認することが出来た。また、標的配列に相同な配列を両端に持つドナーDNA の同時挿入により相同組み換えを用いたGFP ノックインに成功した。現在、標的配列を様々に設定し標的配列間における変異導入効率の差の検討を行うとともに、実験条件の最適化によるCRISPR/Cas9システムの改良、変異導入効率の向上、さらにはゲノム編集による遺伝子発現ネットワーク解析を検討中である。これらの結果について報告する。

genome editing, CRISPR/Cas9, secondary metabolism

発表責任者：浜竜哉（hama.ryuya.36m@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3J28a03
講演日時：3 月 19 日 09:50～ J 校舎 28 会場

# モモ花粉稔性の高精度 DNA マーカーの開発

# Development of an accurate DNA marker for male sterility of peach

○小田 賢司[1]、原 美由紀[1]、田村 隆行[2]、日原 晴介[2]([1]岡山県農総セ生科研、[2]岡山県農総セ農研)
○Kenji Oda[1], Miyuki Hara[1], Takayuki Tamura[2], Seisuke Hihara[2] ([1]RIBS Okayama, [2]Res Inst Agric, Okayama Pref Tech Cent Agric Forest Fish)

日本で栽培されているモモの中には、自らでは受粉できない不稔性の品種が少なからず存在する。このような品種を着果させるには、開花期に稔性品種の花粉を採取して人工授粉を行う必要があり、農作業の省力化や結実安定性の点で、不稔性形質は生産者にとって望ましくない形質である。モモは着果に 3 年を要するため、不稔性形質を持たない品種育成を目指すうえで、DNA マーカーを利用して不稔性個体を早期に判別・排除することが育種効率の向上に有効である。しかし、既報の稔性識別用 SSR マーカーは適用できる品種が限られている。我々は、より高精度で普遍的なマーカーを開発するため、モモの稔性に関わる遺伝子を探索した。

モモの稔性形質は、これまでの遺伝学的解析により、第 6 連鎖群の末端付近に座上する一つの遺伝子座により支配されることが知られている。その付近に新たに 55 の SSR マーカーを作成し、32 品種・4 系統を解析したところ、解析集団のシグナルパターンは比較的限られており、7 種のハプログループに大別できることが分かった。各品種・系統の稔性形質から推察して、7 種のハプロタイプのうち 3 種に不稔性の遺伝子が、残りの 4 種に稔性の遺伝子が座上していると推定された。不稔性のハプログループは全体の 6 割を占めており、日本の栽培集団における不稔問題の根深さが伺える。次に、組換えを起こした染色体を利用して、稔性遺伝子の存在領域を 1MB 以下の領域に絞り込んだ。さらに、葉、果肉、葯の RNA-seq 解析を行い、この領域に存在する遺伝子のうち、葉および果肉に比して葯で 10 倍以上有為に発現する遺伝子を 4 つ同定した。主なハプロタイプにコードされるこれらの遺伝子の塩基配列を比較したところ、一つの遺伝子が不稔性ハプロタイプに特異的な塩基置換変異を有することが分かった。さらに、葯における遺伝子発現の経時的変化を調べたところ、この遺伝子のみ一過的に強く誘導されることが明らかになり、その時期は不稔性品種の花粉発達に異常が生じる時期と重なっていた。シロイヌナズナにおける相同遺伝子の変異は、モモと同様、花粉の発達異常による不稔性を示すことが示されている。そこで、モモの様々な品種・系統について変異の有無と稔性形質を比較したところ、両者は完全に一致し、この変異はモモの花粉稔性を識別する新しいマーカーになると考えられた。

Peach, Male sterility, DNA marker

講演番号：3J28a04
講演日時：3 月 19 日 10:05～ J 校舎 28 会場

# SDI1 によるグルコシノレート生合成の抑制機構の解析
# Inhibition mechanism of GSLs biosynthesis by SDI1

○草島 美幸[1]、丸山 明子[2]、仲下 英雄[1] ([1]福井県大生資、[2]九大農)
○Miyuki Kusajima[1], Akiko Maruyama[2], Hideo Nakashita[1] ([1]Fukui Pref. Univ., [2]Kyushu Univ.)

アブラナ科植物が生産する含硫化合物であるグルコシノレート(GSLs)は、病原体等の外敵に対する防御物質として機能し、また、硫黄栄養の貯蔵物質としての機能も有している。GSLsはトリプトファン、フェニルアラニン、メチオニン等の数種のアミノ酸から生合成されるが、そのうちメチオニン由来のグルコシノレート（mGSL）の中には強い抗腫瘍活性を有するものがあることが明らかとなっている。植物のGSLs生合成の調節については、複数のMYB転写因子（MYB28、MYB29、MYB76）がGSLs生合成を正に制御するが、低硫黄条件下では硫黄をアミノ酸合成に利用するためにGSLs生合成量は抑制されることが明らかになっている。これまでに、シロイヌナズナにおいて、SDI1およびSDI2（sulfur deficiency induced 1,2）がmGSL生合成の抑制因子であることを明らかにしていたが、その詳細なメカニズムは明らかとなっていなかった。そこで本研究では、低硫黄条件下においてSDI1がmGSL生合成を抑制する分子機構の解析を行った。

SDI1 は細胞核内に局在し、mGSL 生合成遺伝子の発現を抑制することが示され、MYB28 は mGSL 生合成遺伝子 CYP79F1 および CYP83A1 のプロモーター領域に結合して転写を活性化することが EMSA 解析により示された。EMSA 解析において、MYB 結合配列を含む DNA プローブを用いた場合には MYB28-DNA 複合体に加えて SDI1-MYB28-DNA の 3 分子複合体が検出されたが、MYB 結合配列に変異を導入した場合には、これらの複合体は検出されなかった。したがって、SDI1 は MYB28 と DNA との結合を阻害しないことが示された。これらの結果から、SDI1 による mGSLs 生合成遺伝子の発現抑制は、MYB28-DNA 複合体に SDI1 が結合することにより、何らかの転写抑制機構が働くためであることが示された。この複合体形成機構の解明を進めることにより、有用物質である mGSL の生産制御技術の開発が可能になると期待される。

Arabidopsis, glucosinolates, transcription factors

発表責任者：草島美幸（pt-kusajima@fpu.ac.jp）

講演番号：3J28a05
講演日時：3 月 19 日 10:20～ J 校舎 28 会場

植物共生微生物が誘導する病害抵抗性のメカニズムの解析
Mechanisms of priming in tomato induced by symbiotic microorganisms
○藤田 萌香[1]、草島 美幸[1]、奥村 泰子[1]、西内 巧[2]、仲下 英雄[1]([1]福井県大生資、[2]金沢大)
○Moeka FUJITA[1], Miyuki KUSAJIMA[1], Yasuko OKUMURA[1], Takumi NISHIUCHI[2], Hideo NAKASHITA[1] ([1]Fukui Pref. Univ., [2]Kanazawa Univ.)

植物内部に共生する微生物の中には宿主植物の病害抵抗性を誘導するものがあることが知られているが､その抵抗性誘導メカニズムの詳細は解明されていない｡細菌エンドファイト *Azospirillum* sp. B510 は定着したイネやシロイヌナズナにおいて病害抵抗性を誘導することが明らかにされているが、その抵抗性は生育抑制を伴わないプライミングであることが示されている。一方、アーバスキュラー菌根菌（AMF）の共生も病害抵抗性を誘導する報告があるが、そのメカニズムは不明である。これらの微生物が根部に感染して定着することにより地上部に誘導される病害抵抗性は共通するメカニズムを有する可能性が高く、両者を比較することによって植物のプライミングのメカニズムを明らかにすることができると考えられる。しかし、AMF はシロイヌナズナには感染せず、水稲では十分な定着効果が望めないことが知られており、両微生物により誘導される病害抵抗性を比較して解析するためには、共通の実験系の構築が必要であると考えられた。そこで、本研究では、それらの抵抗性機構を比較してプライミングのメカニズムを解明することを目的として、トマトを用いて両微生物により誘導される病害抵抗性を検定する実験系を構築して解析した。

播種 1 週間後のトマト（桃太郎）に B510 株または AMF を処理し、植物へ定着させた。2 週間後の個体の地上部に病原細菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC30000 を浸潤接種し、葉組織中の細菌の増殖量により抵抗性を評価した。接種試験の結果、いずれの共生微生物処理区においても無処理区と比較して抵抗性の増強効果が認められた。したがって、これらの実験系を用いることにより、B510 株と AMF による誘導される抵抗性メカニズムを比較することが可能となった。B510 株処理区では、病原細菌接種前までに、サリチル酸の蓄積やサリチル酸およびジャスモン酸応答性の防御応答遺伝子の発現の有意な上昇は認められなかった。現在は AMF の定着の際のこれらの変動について解析を進めており、今後は、両微生物の定着により誘導される遺伝子の網羅的解析についても進める予定である。

Tomato, disease resistance, symbiosis

発表責任者：仲下英雄（nakashita@fpu.ac.jp）

講演番号：3J28a06
講演日時：3 月 19 日 10:45～ J 校舎 28 会場

# 窒素固定能を持つシアノバクテリア *Nostoc* sp.を共生させるソテツリターに含まれるホルモゴニア分化誘導因子の探索

# Search for hormogonia-inducing factor from a litter of *Cycus revoluta* that accepts a nitrogen-fixing cyanobacterium *Nostoc* sp. as a symbiont

○西塚 紘明、橋床 泰之（北大院農）
○Hiroaki NISHIZUKA, Yasuyuki Hashidoko (Hokkaido Univ.)

【背景】 窒素固定能を持つことで知られる *Nostoc* 属シアノバクテリアは、複数の光合成植物と相利的共生関係を構築することができる。*Nostoc* sp.が宿主植物と相利共生系を構築する場合、その初期段階において、宿主植物から放出されるホルモゴニア分化誘導因子 (hormogonia-inducing factor, HIF) によって *Nostoc* sp.は運動性を有するホルモゴニアへと分化し、宿主へ接近することができるようになる。我々の研究グループは既にソテツ・サンゴ状根から 1-palmitoyl-2-linoleoyl-*sn*-glycerol を HIF として単離同定しているが、これは自然界にありふれた化合物であり、広範囲の土壌生 *Nostoc* 属シアノバクテリアの分化に関与する、宿主に特徴的な HIF 活性化合物がソテツ - シアノバクテリア共生系を成立させるシグナル物質として機能していると考えられる。本研究では、ソテツ (*Cycus revoluta*) リターに含まれる二次代謝産物に着目し、リターからの溶脱によって機能する HIF の探索を試みた。

【方法】 本研究で用いた *C. revoluta* リターは、2015 年 7 月に屋久島で採取した。HIF 活性の検定には、窒素フリーの BG-$11_0$ 平板培地 (gellan 1.5%, sucrose 0.2%) で 16 時間光照射下、2 週間前培養したソテツ・サンゴ状根由来の *Nostoc* sp. 継代株糸状体コロニーを緩やかに砕き、70 mesh の金属網で篩い分けによって、非運動性コロニー塊を 0.2 mm 径以下に整えた。これを新たな BG-$11_0$ 平板に均一に広げ、16 時間光照射下で 1 週間プレ培養後、検定試料をロードしたペーパーディスク (最低活性量 0.1 nmol/disc) を乗せ、ディスク周辺の生菌体の応答を蛍光顕微鏡下で経時的に定点観察した。本研究室で単離同定された HIF である 1-palmitoyl-2-linoleoyl-*sn*-glycerol を合成し、陽性対照に用いた。

【結果･考察】乾燥状態の *C.revoluta* リターを MeOH に浸漬し、減圧濃縮後水に再懸濁し、等量の EtOAc、*n*-BuOH で順次液液分配を行い、水層と各溶媒転溶部をそれぞれ HIF 活性検定試験に供したところ、EtOAc 転溶画分に強い HIF 活性が認められた。この活性画分を各種クロマトグラフィーで追跡し、得られた活性フラクションを濃縮後クロロフォルム-メタノール系溶媒に再溶解し低温で保存した溶液から，針状結晶として析出した化合物に強い HIF 活性が認められた。これを濾別後、質量分析に供したところ、これが *m/z* 638.57 の有機化合物であることが確認された。現在、この化合物の構造決定に取り組んでいる。*C. .revoluta* リターMeOH 抽出物から、ジアシルグリセロール類とは異なる強い HIF 活性化合物の存在が認められたことから、この化合物は自然界において土壌周辺のシアノバクテリアをホルモゴニアに分化させる主たる共生シグナル物質として機能していると考えられた。

hormogonia-inducing factor, cyanobacteria, symbiosis

講演番号：3J28a07
講演日時：3 月 19 日 11:00～ J 校舎 28 会場

植物の罹病応答が食害虫の嗜好性に与える影響の解析
Analysis of the effect of plant disease response for insect pest preference
○植田 浩一、釘宮 聡一、田端 純、光原 一朗、北本 宏子（農研機構）
○HIROKAZU UEDA, SOICHI KUGIMIYA, JUN TABATA, ICHIRO MITSUHARA, HIROKO KITAMOTO (NARO)

植物が、病気または害虫各々の被害を受けた場合の応答機構はよく研究されている。活物菌（ウイルスなど）に感染すると、植物ホルモンのサリチル酸（SA）を介した情報伝達経路が主として働く防御応答を発現する。一方で、殺生菌（一部の糸状菌など）の感染や害虫による食害ストレスは、主として植物ホルモンのジャスモン酸（JA）を介した情報伝達経路が働く。また、この２つのストレス応答は、拮抗する関係にあることも知られている。しかし、屋外の植物は病原菌や害虫から同時にストレスを受ける場合も多い。そこで本研究では、植物の病気に対するストレス応答が、害虫の嗜好性に与える影響を明らかにすることとした。植物体としてトマト、病原体としてトマトモザイクウイルス（ToMV）を用い、ToMV をあえて媒介しない害虫であり、かつ農業上重要な難防除害虫でもあるタバココナジラミの行動を解析した。

まず、植物は、ToMV の感染により、顕著に SA の蓄積量が増加するとともに、SA 関連の防御応答遺伝子の発現が誘導されることを確認した。タバココナジラミが、罹病植物と健全植物のどちらに好んで産卵するかを調査したところ、健全植物により産卵することが明らかとなった。また、健全、罹病植物それぞれの上に産卵された卵の生育を調査したところ、罹病植物上では卵の孵化率や成虫までの生存率が低下していた。植物の病害応答がタバココナジラミの嗜好性に与える影響を調査するために、SA を蓄積することのできないトマト（SA 加水分解酵素である NahG 導入株）を作成し、野生型植物と NahG 植物に対するタバココナジラミの嗜好性を調査した。その結果、ToMV を接種した NahG 植物と、疑似接種した NahG 植物は、同程度の嗜好性であった。一方、タバココナジラミの食害自体によっても、植物に SA が蓄積する。健全な野生型および NahG 植物に対するタバココナジラミの嗜好性を試験したとろ、SA を蓄積しない NahG 植物により多く産卵した。

これらの結果から、植物の耐ウイルス性応答によって蓄積した SA が、害虫の嗜好性に影響を及ぼす仕組みについて考察する。

plant-microbe interaction, plant-insect interaction, phytohormon

講演番号：3J28a08
講演日時：3 月 19 日 11:15～ J 校舎 28 会場

植物感染性線虫に対する誘引物質の探索
Analysis of attractant of plant parasitic nematode

○大田 守浩[1]、井田 隆徳[2]、橋口 正嗣[3]、明石 良[3]、島岡 知恵[1]、鈴木 れいら[1]、石田 喬志[1]、澤 進一郎[1] ([1]熊大自然科学、[2]宮大フロンティア、[3]宮大農)
○Morihiro Oota[1], Takanori Ida[2], Masatugu Hashiguti[3], Ryo Akashi[3], Chie Shimaoka[1], Reira Suzuki[1], Takashi Ishida[1], Shinichiro Sawa[1] ([1]Kumamoto Univ., [2]Miyazaki Frontier Univ., [3]Miyazaki Univ.)

植物感染性線虫の一種であるサツマイモネコブセンチュウは、サツマイモやトマトなどの農作物に感染し、全世界で年間数十兆円の被害があると試算されている。

このサツマイモネコブセンチュウは、植物の根端付近から侵入して感染するが、根の位置を認識する為に、根から分泌される何らかの化合物を誘引物質として利用していると考えられる。しかし、これまでに植物由来の線虫誘引物質はまだ同定されておらず、深刻な線虫被害を抑えるためにも、その解明が急務である。

誘引物質を単離するために、本研究ではセイヨウミヤコグサの培養根より単離された Super root 系統を用いた。Super root は、地上部なしで（根のみ）で液体培養が可能で、植物ホルモン非存在下でも根だけで持続的に成長が可能である。我々は Super root の培養液に線虫誘引活性が存在することを確認した。さらに、この培養液を様々なクロマトグラフィー等を用いて分離することにも成功しており、誘引物質の同定は近いと考えている。

一方、約 1600 種類の Chemical Library スクリーニングから、2 種類の誘引活性のある化合物を発見した。この 2 つの化合物には共通した構造がある事が分かり、さらにこの特徴をもつ類縁体化合物が植物からも検出された。現在のところ、この化合物が線虫の誘引物質として働いているのか、詳細に解析している段階である。

このような植物由来の誘引物質は、”線虫ホイホイ”として応用することにより、環境にほとんど負担をかけずに、線虫を一網打尽にして駆除する線虫トラップを開発することも可能であると考えられる。さらに、この線虫誘引物質に関する研究は、応用面だけではなく、未だ明らかになっていない、多細胞植物-多細胞動物間の交信（相互作用）に関する分子機構を明らかにするものであり、未知の生物間植物ホルモンの発見にも繋がる可能性があると考えている。

本発表では、我々の研究の現状について紹介し、誘引物質の同定に向けた研究の方向性について、是非とも議論させていただきたいと考えている。

Plant parasitic nematode, Attractant, Plant

発表責任者：大田守浩（126s6006.kumadai@gmail.com）

講演番号：3J28a09
講演日時：3 月 19 日 11:30～ J 校舎 28 会場

# サツマイモネコブセンチュウの巨大細胞形成過程におけるエフェクターたんぱく質 MjD15 の機能解析

# Functional analysis of MjD15 during infection of root-knot nematode in *Arabidopsis thaliana*

○光増 可奈子[1]、豊島 主峰[2]、山口 泰華[1]、石田 喬志[3]、澤 進一郎[1]（[1]熊大院 先端科学、[2]熊大院 自然科学、[3]熊大 IROAST）
○Kanako MITSUMASU[1], Yukitaka TOYOSHIMA[2], Yasuka L. YAMAGUCHI[1], Takashi ISHIDA[3], Shinichiro SAWA[1] ([1]FAST, Kumamoto Univ., [2]GSST, Kumamoto Univ., [3]IROAST, Kumamoto Univ.)

【目的】 ネコブセンチュウなどの、植物内部に定住する寄生性線虫は、宿主への感染過程で、エフェクターたんぱく質と呼ばれる分泌たんぱく質群を宿主細胞に注入し、注入された宿主細胞は、多核で細胞質の豊富な巨大細胞に改変される。巨大細胞は、細胞分裂を伴わない核分裂が繰り返し起こることで形成される。シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）において、細胞質分裂に関わる、MAPK カスケードの標的たんぱく質である MAP65-3 の機能喪失変異体では、サツマイモネコブセンチュウ（*Meloidogyne incognita*）が感染すると、不完全な巨大細胞を形成することが報告されている（Caillaud *et al*., 2008）。一方、Yeast Two Hybrid 法によって、*M. incognita* のエフェクターたんぱく質 MjD15 が、MAP65-3 の上流の ANP MAPKKK と相互作用することが分かった。そこで、MAPK カスケードによる巨大細胞形成の制御機構と、センチュウエフェクターたんぱく質の作用機構を明らかにすることを目的とした。
【方法と結果】 まず、*ANP*, *MAP65-3* と、それ以外の MAPK カスケードの構成因子をコードする *NACK1*, *MKK6*, *MPK4* も含めて、ネコブにおける遺伝子発現を検証した。プロモーターGUS ラインを用いた解析、及び、ネコブでの RNA-seq 解析によって、各遺伝子はネコブの成長過程において、恒常的に発現していることがわかった。次に、各遺伝子の変異体にセンチュウを感染させ、形成されたネコブの切片を作製し、内部構造を観察した。その結果、*map65-3* について既に報告されている様に、各変異体で形成された巨大細胞は、野生型で形成された巨大細胞よりサイズが小さく、成熟した雌の数も少ない傾向が見られた。そこで、細胞のサイズや成熟個体数について、より詳細な解析を行っている。また、Yeast Two Hybrid 法によって、*M. incognita* のエフェクターたんぱく質 MjD15 は、ANP1 及び ANP2 の kinase domain と相互作用していることを確認した。以上の結果より、センチュウはエフェクターたんぱく質によって、細胞質分裂に関わる ANP のキナーゼ活性を修飾することで、機能的な巨大細胞の形成を促していると考えられた。現在、MjD15 と ANP1, 2 との相互作用が、ANP の機能を抑制しているのか、或いは亢進しているのかを明らかにするための解析を進めている。

root-knot nematode, giant cell, effector protein

発表責任者：光増可奈子（mitsumasu@sci.kumamoto-u.ac.jp）

講演番号：3J28p01
講演日時：3 月 19 日 14:00～ J 校舎 28 会場

# ポリエステル生産菌 *Ralstonia eutropha* の補充経路改変によるポリヒドロキシアルカン酸生合成への影響解析

# Effects of anaplerotic pathway modification on polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Ralstonia eutropha*

○洞口 萌実、清水 理恵、折田 和泉、中村 聡、福居 俊昭（東工大・生命理工学院）
○Moemi HORAGUCHI, Rie SHIMIZU, Izumi ORITA, Satoshi NAKAMURA, Toshiaki FUKUI (Sch. Life Sci. & Technol, Tokyo Tech.)

【背景・目的】

ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は再生可能なバイオマス資源を原料とするポリエステルであり、生分解性・熱可塑性・生体適合性などの特徴をもつことから環境調和型高分子材料としての利用が期待されている。水素細菌 *Ralstonia eutropha* は糖・有機酸などの炭素源から代表的な PHA であるポリ[(*R*)-3-ヒドロキシブタン酸] [P(3HB)] を高い蓄積率で生合成する。しかしながら、フルクトースを炭素源とした際の本菌による P(3HB) 収率は理論収率の約 7 割にとどまる。先行研究によって、本菌での培地中へのアミノ酸・有機酸・糖質の分泌はほとんどないこと、細胞内に蓄積される二糖類・多糖類は P(3HB) 収率に影響しない量であることがすでに明らかになっている。したがって、糖質から Entner-Doudoroff 経路によって生じたアセチル-CoA が、増殖を伴わない P(3HB)生合成条件でも TCA サイクルにより $CO_2$ にまで完全酸化されている可能性が考えられた。そこで、本研究では *R. eutropha* におけるアセチル-CoA から PHA 生合成へのフラックス強化を目的として、TCA サイクルの維持に必要な補充経路の改変を試みた。

【方法・結果】

*R. eutropha* の主要なオキサロ酢酸補充経酵素であるホスホエノールピン酸カルボキシラーゼ遺伝子（*ppc*）破壊株の増殖特性と P(3HB) 生合成の解析、および培養上清の分析を行った。*ppc* 破壊株ではフルクトース炭素源で増殖に著しい遅れが見られたため、培地にクエン酸を添加することで TCA サイクルを維持した。通常、*R. eutropha* は窒素源などが欠乏した増殖不適条件で P(3HB) を蓄積するが、*ppc* 破壊株では対数増殖期から P(3HB) を蓄積し、窒素源濃度などによる P(3HB) 合成の抑制が解除されていると考えられた。また、添加したクエン酸が枯渇すると同時に窒素源消費が停滞し、その後に窒素源消費が再開することが示され、なんらかの代謝の切り替えが起こっていることが推察された。

TCA サイクル駆動の制御に向け、*ppc* または TCA サイクルの初発酵素であるクエン酸シンターゼ遺伝子 (*gltA*) のプロモーター領域を、増殖期での転写活性が高く、PHA 蓄積期での転写活性が低いプロモーター領域に置換する相同性組換えを行った。現在、プロモーター領域置換による PHA 生合成への影響を検討中である。

*Ralstonia eutropha*, polyhydroxyalkanoate, anaplerotic pathway

講演番号：3J28p02
講演日時：3 月 19 日 14:15～ J 校舎 28 会場

# 大腸菌を宿主とした人工経路によるグルコースからのポリ(3-ヒドロキシブタン酸-*co*-3-ヒドロキシヘキサン酸)生合成

# Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate) from glucose via artificial pathway by *Escherichia coli*

○齊藤 周、Chayatip Insomphun、折田 和泉、中村 聡、福居 俊昭（東工大・生命理工学院）
○Shu Saito, Chayatip Insomphun, Izumi Orita, Satoshi Nakamura, Toshiaki Fukui (Sch. Life Sci. & Technol, Tokyo Tech.)

【目的】ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は、広範な微生物が菌体内に蓄積する生分解性ポリエステルである。代表的な PHA であるポリ((*R*)-3-ヒドロキシブタン酸) [P(3HB)] は硬くて脆い物性を示すのに対して、$C_4$ ユニットと $C_6$ ユニットの共重合体であるポリ((*R*)-3-ヒドロキシブタン酸-*co*-(*R*)-3-ヒドロキシヘキサン酸) [P(3HB-*co*-3HHx)] は柔軟性に優れたバイオプラスチックである。*Ralstonia eutropha* H16 株は代表的な P(3HB)生産菌として知られており、フルクトースを炭素源として P(3HB)を効率よく生合成し菌体内に蓄積する。先行研究では、*R. eutropha* において *Methylobacterium extorquens* 由来クロトニル-CoA カルボキシラーゼ/レダクターゼ ($Ccr_{Me}$) と *Mus musculus* 由来エチルマロニル-CoA 脱炭酸酵素 ($Emd_{Mm}$) により生成するブチリル-CoA を 3HHx モノマーの前駆体とする代謝経路を構築し、フルクトースから 48 wt%の P(3HB-*co*-22 mol% 3HHx)の生合成に成功している。本研究では、遺伝子操作ツールや代謝に関する知見が豊富であり、増殖が速いことから物質生産の宿主として汎用される *Escherichia coli* に P(3HB-*co*-3HHx)共重合体生合成経路を導入し、グルコースを基質とした効率的な P(3HB-*co*-3HHx)の生合成を目的とした。

【方法および結果】*E. coli* JM109 株を宿主とし、$P_{lac}$、$P_{tac}$、または *R. eutropha* 由来 PHA 顆粒結合タンパク質 PhaP1 のプロモーター領域（$P_{phaP1}$）の下流に P(3HB-*co*-3HHx)生合成経路を構築する外来遺伝子を挿入したプラスミドベクター3 種を構築し、塩化カルシウム法により導入した。作製した三重形質転換体は 2%グルコースおよび 0.5 mM IPTG を添加した LB 培地で 48 時間振とう培養した。37℃における培養で蓄積した PHA は $C_6$ ユニットを含有しない P(3HB)ホモポリマーであった一方で、30℃における培養では P(3HB-*co*-3HHx)共重合体の蓄積が確認された。さらにプロモーターや導入する遺伝子の組合せが異なる株を構築し、PHA 生合成能を検討した。その結果、$ccr_{Me}$ および $emd_{Mm}$ を $P_{tac}$ 下流に配置し、加えて広基質特異性β-ケトチオラーゼ遺伝子である *R. eutropha* 由来 $bktB_{Re}$ を導入した株において、43 wt%の P(3HB-*co*-16 mol% 3HHx)の生合成に成功した。現在、導入プラスミド数を減らすことによる宿主株への負荷の軽減、酢酸生成経路の欠失などによる生産性向上や、人工生合成経路の改変による蓄積率や共重合組成への影響について検討している。

polyhydroxyalkanoate, poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate), *Escherichia coli*

発表責任者：福居俊昭（tfukui@bio.titech.ac.jp）

講演番号：3J28p03
講演日時：3 月 19 日 14:30～ J 校舎 28 会場

パルプ製造廃液を炭素源とした乳酸ベースポリマーの生産
Microbial production of lactate-base polymer using extract from pulp making process
○大井 俊彦[1,2]、滝沢 憲治[1,2]、松本 謙一郎[1]、田口 精一[1,2] ([1]北大院工、[2]JST-CREST)
○ Toshihiko OOI[1,2], Kenji TAKISAWA[1,2], Ken'ichiro MATSUMOTO[1], Seiichi TAGUCHI[1,2] ([1]Hokkaido Univ., [2]JST-CREST)

**【目　的】**製紙産業では膨大な木質バイオマスからパルプを製造している。その中でレーヨン等に加工される溶解パルプの製造時に多量に排出される前処理抽出液には、キシロースを主成分としたヘミセルロースが多量に含まれるが、その多くは焼却により処理されている。未利用廃棄物バイオマス資源の有効利用の観点から、この前処理抽出液加水分解物からのバイオポリマーの生産を検討した。

我々は、微生物産生ポリエステルであるポリヒドロキシアルカン酸（PHA)の生合成系を改変することにより、乳酸ベースポリマーを微生物合成することに初めて成功している。さらに、組換え大腸菌を宿主プラットフォームとして、キシロースを炭素源として培養すると、グルコースと比較して天然型の PHA を上回る生産性が得られることも見出している。 そこで本研究では、本抽出液の加水分解物を炭素源とした乳酸ベースポリマー生産の検討を行った。

**【方法・結果および考察】**前処理抽出液を濃縮後、硫酸加水分解することでキシロースおよびガラクトースを主単糖成分とした糖化液を調製した。糖成分以外の不純物を含むこの糖化液を炭素源として組換え大腸菌により乳酸ベースポリマーの生産を試みたところ、大腸菌の増殖は見られたが、培地中に添加した糖がほぼ消費されずポリマーの生産は観察されなかった。そのため、糖化液に含まれる不純物の除去を目的に、活性炭処理およびイオン交換樹脂カラムにより糖化液を精製しポリマー生産を検討した。はじめに、活性炭処理した糖化液ではポリマーが生産されなかったため、不純物として高濃度に含まれる酢酸がポリマー生産を阻害していると考えられた。そこで，酢酸濃度とポリマー生産との関係を検討したところ，酢酸濃度に依存してポリマー生産量は低下することがわかった。活性炭処理糖化液から酢酸を除去するために、さらにイオン交換処理で精製した糖化液を用いてポリマー生産を行ったところ，純粋キシロースおよびガラクトースの混合糖液とほぼ同等のポリマー生産性を示すことが分かった。

bio-based polymer, bioplastic, microbaial production

講演番号：3J28p04
講演日時：3 月 19 日 14:45～ J 校舎 28 会場

組換え大腸菌による乳酸ポリマー生産のためのキシロースを炭素源とした高密度培養
High cell density fermentation for lactate-based polymer production in recombinant *E.coli*
○滝沢 憲治[1,2]、Ribordy Greg[3]、山崎 貴史[1]、松本 謙一郎[1]、大井 俊彦[1,2]、Zinn Manfred[3]、田口精一[1,2] ([1]北大院工、[2]JST-CREST、[3]HES-SO)
○Kenji Takisawa[1,2], Greg Ribordy[3], Takashi Yamazaki[1], Ken'ichiro Matsumoto[1], Toshihiko Ooi[1,2], Manfred Zinn[3], Seiichi Taguchi[1,2] ([1]Hokkaido Univ., [2]JST-CREST, [3]HES-SO)

【研究背景】
ある種の微生物は植物由来の糖などのバイオマスを原料として細胞内にポリヒドロキシアルカン酸（PHA）と呼ばれるポリエステルを合成することができる。当研究室では，乳酸重合酵素を発現する組換え大腸菌を用いて，同一ポリマー鎖内に乳酸（LA）ユニットと 3-ヒドロキシブタン酸（3HB）ユニットが共重合された P(LA-*co*-3HB)の生合成の開発を行っている。P(LA-*co*-3HB)は柔軟性と透明性を有するバイオベースプラスチックである。本ポリマー生産のための糖源として，リグノセルロースの第二主要構成成分であるキシロースを炭素源に用いると，第一主要構成成分であるグルコースに比べ高い生産性および乳酸分率の向上が得られる。本研究では，溶解パルプ製造過程で排出されるキシロースベースのバイオマスである木質抽出液をバイオベースプラスチック生産のための炭素源として利用することを計画している。この木質抽出液を用いた大規模生産に向けたバイオベースプラスチック培養の最適化のため，ジャーファーメンターを使用したキシロースを用いたフェドバッチ培養による高密度生産の検討を行った。

【方法および結果】
キシロースが大腸菌において lac プロモーター支配下の遺伝子の発現誘導剤としても作用することに着目し，キシロースで誘導可能な lac プロモーターの制御下にポリマー生産系遺伝子群を挿入したプラスミドを構築し，誘導剤としてキシロースを用いた二段培養法による高密度ポリマー生産を行った。培養は温度 30℃，通気量 3 L/min，撹拌速度 700 rpm としグルコースを添加した MR 培地で培養を開始し，グルコースが枯渇する時点で，キシロースおよび窒素源を流加するフェドバッチ培養に切り換えた。その結果，初発糖及び流加糖にグルコースのみ，またはキシロースのみを使用した場合に比べ，高い菌体量およびポリマー生産量が得られた。またこのフェドバッチ培養により得られたポリマー蓄積量はバッチ培養で得られたポリマー生産量の約 2 倍であった。このことから，今回検討した二段培養法が P(LA-*co*-3HB)生産に有効であることが示された。

biopolymer, xylose, high cell density fermentation

発表責任者：田口精一（staguchi@eng.hokudai.ac.jp）

講演番号：3J28p05
講演日時：3 月 19 日 15:00～ J 校舎 28 会場

# 非天然ポリステル合成のための重合酵素の高活性化

# Engineering of polyester synthase for microbial production of unusual polymers

○松本 謙一郎[1,2]、大石 健太[1]、大井 俊彦[1,3]、田口 精一[1,3]([1]北大工、[2]ALCA-JST、[3]CREST-JST)
○Ken'ichiro MATSUMOTO[1,2], Kenta OISHI[1], Toshihiko OOI[1,3], Seiichi TAGUCHI[1,3] ([1]Hokudai, [2]ALCA-JST, [3]CREST-JST)

ある種の微生物はポリヒドロキシアルカン酸（PHA）と総称されるポリエステルを細胞内に蓄積する。PHA は生分解性を有するバイオベースプラスチックとして利用可能なため、環境低負荷型材料として期待される。PHA は、モノマーとなる hydorxyacyl-CoA が PHA 重合酵素により重合されることにより合成される。天然の PHA 生産菌が合成するポリマーは、3 位に水酸基を有するモノマーから構成されるが、人工的なモノマー供給を行うことで、4 位または 5 位に水酸基を持つ基質も重合可能である。重合可能なモノマーの構造は、重合酵素の基質特異性により決定される。我々の研究グループは、改変型 PHA 重合酵素を用いることにより、2 位に水酸基を有する乳酸、グリコール酸、2-hydroxy 酪酸などをモノマーユニットとして含むポリマーを微生物合成できることを初めて報告した。これらの非天然型のポリマーは、天然型の PHA とは異なり高い透明性や加水分解性などの性質を示すことから、本改変型重合酵素は、多様な物性を有するポリマー材料を微生物合成するための有用なツールとなる。

本研究は、改変型重合酵素に新たな変異を導入することにより、非天然モノマーの重合能力が強化された新たな重合酵素変異体を取得することを目的とした。当研究グループのこれまでの知見により、重合酵素の活性、基質特異性に影響を与える重要残基が特定されており、この部位に飽和変異を導入して、優良変異体のスクリーニングを行った。優良変異体の選抜のために、重合酵素に変異を持つポリマー合成系遺伝子群を導入した組換え大腸菌を作成し、寒天培地上でポリ-2-hydroxy 酪酸を蓄積させた。その後色素染色による半定量法に基づいて、ポリマー蓄積率を指標としたスクリーニングを行った。その結果、親遺伝子と比較して、ポリマーの合成量が優位に増加する新たな変異遺伝子を８種類単離した。ポリマーの蓄積量は、最大で約 3 倍に増加していた。そのうち、最もポリマー蓄積量の多かったものについて、組換え大腸菌の粗酵素抽出液中の重合酵素活性を測定したところ、優位な活性の上昇が確認できた。酵素の発現量は親遺伝子導入株と比較してむしろ低下していたことから、酵素分子当たりの活性が向上したと考えられた。加えて、今回取得した変異型重合酵素では、親酵素と比較してポリマー分子量が上昇する傾向が見られた。上記の結果から、従来型よりも優れたポリマー合成能力を有する変異型酵素の取得に成功した。

Biodegradable plastic, Polyhydroxyalkanoate synthase, In vitro evolution

講演番号：3J28p06
講演日時：3 月 19 日 15:25～ J 校舎 28 会場

*Burkholderia* 属細菌によるポリヒドロキシブタン酸の合成
Microbial production of polyhydroxybutyrate by *Burkholderia* sp. bacterium
○山端 勇貴、幸田 有以、花角 優太、山田 美和、下飯 仁（岩大農）
○Yuki YAMAHATA, Ai YUKITA, Yuta HANAZUMI, Miwa YAMADA, Hitoshi SHIMOI (Iwate Univ.)

【目的】ポリヒドロキシアルカン酸（PHA）は微生物がエネルギー貯蔵物質として合成する脂肪族ポリエステルであり、生分解性を有するバイオプラスチックであるため、石油系プラスチックに代わる低環境負荷型の材料として期待されている。バイオプラスチックの開発では、食料生産と非競合の未利用資源を原料として使用することが望ましいが、我々は、岩手県の養殖場において処理が問題となっており、有効活用が望まれる海藻廃棄部位に注目した。当研究室では、これまでに海藻成分（マンニトール、アルギン酸、セルロース等）を資化可能な PHA 合成菌を探索し、マンニトールを炭素源として、典型的な PHA であるポリヒドロキシブタン酸(PHB)を産生する M5M02 株を取得してきた。そこで、本研究では、M5M02 株の同定および本菌株が PHB 高蓄積する培養条件の検討を行った。さらに、本菌がマンニトール以外の炭素源を利用して PHB を合成可能かどうかについても検討を行った。
【方法・結果】M5M02 株から抽出したゲノム DNA を鋳型とし、PCR によって 16S rDNA（約 1,500 bp）を増幅した。得られた 16S rDNA の塩基配列をシークエンス解析し、BLAST を用いて GenBank に対する相同性検索を行った結果、本菌の 16S rDNA は、相同率 99%で *Burkholderia fungorum* の 16S rDNA と最も高い相同性を示し、相同性の高い上位 10 菌株は全て *Burkholderia* 由来の 16S rDNA が占めていた。さらに、形態観察、運動性試験、カタラーゼ試験、オキシダーゼ試験において *Burkholderia* 属細菌と同様の表現型を示した。よって、M5M02 株は *Burkholderia* 属細菌であると推定した。続いて、本菌がマンニトールを炭素源とした際の PHB 高蓄積条件を検討した。菌体の培養は、マンニトールを単一炭素源とした貧栄養培地 150 mL において 30℃ 条件下で行った。集菌後の菌体を凍結乾燥し、クロロホルムによって合成した PHB を抽出した。結果、pH 5.0 でマンニトールを 10%添加した培地で 3 日間培養した際、最も高い PHB 蓄積率（43%）となった。また、炭素源としてフルクトース、グルコース、グルコン酸、グリセロール、マルトース、スクロス、キシロース、可溶性デンプン、および芳香族化合物（ベンゼン、トルエン、キシレン、フェノール、p-ニトロフェノール、ビフェニル、ナフタレン）を用いて培養を行った結果、フルクトースを単一炭素源とした際、最も PHB 蓄積量が高く、グルコース、キシロース、グリセロールは、マンニトールを単一炭素源とした際と同等の PHB 蓄積率を示した。さらに、菌体の生育が非常に低かったが、p-ニトロフェノールおよびナフタレンを単一炭素源とした際にもわずかな PHB の蓄積が確認された。よって、本菌株を利用して、多様な炭素源を用いた PHB 合成が可能であると示唆された。

polyhydroxyalkanoate, mannitol, aromatic compounds

講演番号：3J28p07
講演日時：3 月 19 日 15:40～ J 校舎 28 会場

組換え *R. eutropha* による糖からの P(3HB-*co*-3HA)の生合成
Biosynthesis of P(3HB-*co*-3HA) by recombinant *R. eutropha* from sugar

○倉富 優季[1]、脇田 和[2]、後藤 早希[1]、外村 彩夏[2]、田中 賢二[3]、松崎 弘美[1,2] ([1]熊県大院・環境共生、[2]熊県大・環境共生、[3]近大・産理工)
○Yuki KURADOMI[1], Izumi WAKIDA[2], Saki GOTO[1], Ayaka HOKAMURA[2], kenji TANAKA[3], Hiromi MATSUSAKI[1,2] ([1]Grad. Sch. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [2]Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [3]Kinki Univ.)

【目的】微生物が菌体内で合成するポリヒドロキシアルカン酸（PHA）は、環境調和型素材として期待される生分解性プラスチックの一つである。*Ralstonia eutropha* は代表的な PHA 合成細菌であるが、糖を唯一の炭素源として培養すると、炭素数 4 の 3−ヒドロキシブタン酸（3HB）からなる P(3HB)ホモポリマーを合成する。これは、硬くて脆いため、より実用的な材料の合成を目指して、*R. eutropha* の組換え株を作製し、糖から炭素数 4～12 の 3-ヒドロキシアルカン酸（3HA）ユニットからなる共重合ポリエステル P(3HB-*co*-3HA)を合成することを本研究の目的とした。
【方法および結果】大腸菌 LS5218 株に *Pseudomonas* sp. 61-3 の低基質特異性 PHA 重合酵素遺伝子（$phaC1_{Ps}$）、脂肪酸合成経路からの中鎖長 3HA ユニットを供給する(*R*)-3-ヒドロキシアシル ACP チオエステラーゼ（$phaG_{Ps}$）、*R. eutropha* の 3HB ユニット供給系酵素遺伝子（$phbAB_{Re}$）、さらには *Pseudomonas aeruginosa* PAO の(*R*)-3-ヒドロキシアシル CoA ((*R*)-3HA-CoA) リガーゼ遺伝子 (PA3924) を導入した組換え株は、糖（グルコース）を唯一の炭素源として約 20 wt%の蓄積率で P(94.6% 3HB-*co*-3HA)を合成する [1)]。このように大腸菌において糖を唯一の炭素源として脂肪酸合成経路を介して P(3HB-*co*-3HA)を合成する代謝経路を確立したため、同様の系を *R. eutropha* の PHA 重合酵素遺伝子破壊株に導入した。関連遺伝子を *lac* プロモーターの下流に挿入したプラスミドを導入すると、菌の増殖が阻害され PHA をほとんど合成しなかったが、$phaC1_{Ps}$ 遺伝子のみを別のプラスミドに挿入して native プロモーターで発現させると中鎖長 3HA ユニットを 6.2 mol%含む P(94.8% 3HB-*co*-3HA) を合成した。しかし、蓄積率が 8.6 wt%と低いことが今後の課題である。現在、*Pseudomonas* sp. 61-3 からの(*R*)-3HA-CoA リガーゼ活性を持つ遺伝子のクローニングや *R. eutropha* のさらなる分子育種を進めている。

1) Hokamura *et al.*, *J. Biosci. Bioeng*. 120, 305-310 (2015)

Biodegradable plastics, polyhydroxyalkanoate, *Ralstonia eutropha*

発表責任者：松崎弘美（matusaki@pu-kumamoto.ac.jp）

講演番号：3J28p08
講演日時：3 月 19 日 15:55～ J 校舎 28 会場

# 組換え大腸菌による新規乳酸ベースポリマーの生合成

# Biosynthesis of the novel lactate-based polymer by recombinant *Escherichia coli*

○後藤 早希[1]、留野 菜月[2]、外村 彩夏[2]、田口 精一[3]、松本 謙一郎[3]、阿部 英喜[4]、田中 賢二[5]、松崎 弘美[1,2]([1]熊本県大院・環境共生、[2]熊本県大・環境共生、[3]北大院・工、[4]理研、[5]近大・産理工)
○ Saki GOTO[1], Natsuki TOMENO[2], Ayaka HOKAMURA[2], Seiichi TAGUCHI[3], Ken'ichiro MATSUMOTO[3], Hideki ABE[4], Kenzi TANAKA[5], Hiromi MATSUSAKI[1,2] ([1]Grad. Sch. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [2]Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [3]Hokkaido Univ., [4]RIKEN, [5]Kindai Univ.)

【目的】生分解性プラスチックは、使用中は通常のプラスチックと同様に使用でき、使用後は環境中の微生物の働きによって、最終的に水と二酸化炭素にまで分解される環境低負荷型の高分子材料である。ポリ乳酸（PLA）は高い透明性がある優れた生分解性プラスチックである。通常、化学重合により合成されるが、重合の際に重金属を用いること、合成のステップが多いなどの問題がある。最近、微生物合成系のポリヒドロキシアルカン酸（PHA）生合成システムを利用した PLA 様物質の合成が報告されている[1)]。本研究では、大腸菌を宿主として、乳酸（LA）ユニットをはじめ、さまざまなモノマー組成からなる新規乳酸ベースポリマーを合成することを目的とした。
【方法および結果】*Pseudomonas* sp. 61-3 由来改変 PHA 重合酵素遺伝子（*phaC1(STQK)*）、LA ユニットを供給する D-乳酸脱水素酵素遺伝子(*ldhD*)とプロピオニル CoA トランスフェラーゼ遺伝子(*pct*)、3-ヒドロキシブタン酸（3HB）ユニットを供給するβ-ケトチオラーゼ遺伝子（*phbA*）とアセトアセチル CoA リダクターゼ遺伝子（*phbB*）、さらには、中鎖長の 3-ヒドロキシアルカン酸（3HA）ユニットを脂肪酸合成経路から供給するため、(*R*)-3-ヒドロキシアシル ACP チオエステラーゼ遺伝子（*phaG*）と *Pseudomonas aeruginosa* の(*R*)-3-ヒドロキシアシル CoA リガーゼ遺伝子（PA3924）を大腸菌 DH5α、XL1-Blue、LS5218 の 3 株に導入した。これらの組換え株を 2%グルコース含有 LB 培地にて、30°C、48 h 培養した。合成されたポリエステルの菌体内蓄積率とモノマー組成をガスクロマトグラフィーにより分析した結果、組換え株は、LA ユニット、3HB ユニット、そして中鎖長 3HA ユニットからなる新規乳酸ベースポリマーである P(LA-*co*-3HB-*co*-3HA)を合成した。とくに LS5218 の組換え株において 3HA 分率が高まり、P(14.4% LA-*co*-79.5% 3HB-*co*-6.1% 3HA)を合成した。このポリエステルを抽出し、ゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）を用いてポリマーの分子量を測定した。その結果、このポリマーの数平均分子量（Mn）は約 5.3 万、重量平均分子量（Mw）は約 31.7 万、多分散度（Mw/Mn）は 5.9 であった。さらに、NMR 解析を行った結果、LA-3HB 連鎖および 3HB-3HA 連鎖の存在を特定できた。しかしながら、LA-3HA 連鎖の存在を特定することができなかったため、さらに 3HA 分率を高めるための分子育種を検討している。

1)Taguchi, S. *et al.*, *PNAS*, 105, 17323-17327(2008)

biodegradable plastics, polyhydroxyalkanoate, lactate-based polymer

発表責任者：松崎弘美（matusaki@pu-kumamoto.ac.jp）

講演番号：3J28p09
講演日時：3 月 19 日 16:10～ J 校舎 28 会場

(*R*)-3-ヒドロキシ酪酸生産における好気発酵条件の影響
Effect of some aerobic conditions for microbial production of (*R*)-3-hydroxybutyric acid
○世嘉良 宏斗[1]、花城 隆二[1]、合田 雅浩[1]、照屋 盛実[1]、常盤 豊[2] ([1]沖縄県工技セ、[2]産業技術総合研究所)
○ Hiroto Yokaryo[1], Ryuji Hanashiro[1], Masahiro Goda[1], Morimi Teruya[1], Yutaka Tokiwa[2] ([1]Okinawa Ind. Tech. Cent., [2]AIST)

【背景】(*R*)-3-ヒドロキシ酪酸（R3HB）は生分解性ポリマーとして知られるポリヒドロキシ酪酸（PHB）を構成する光学活性有機酸であり、機能性ポリマー等の合成原料として期待されている。また、人間の体内でも生産・利用されている R3HB は、血中濃度を高めることで認知機能を改善する効果があること等も報告されている。一方、好気性微生物の一部は糖類等を原料にして PHB を合成し、自らの菌体内に蓄積させることが知られている。好気条件下で菌体内に蓄積された PHB は、嫌気的な条件下等では微生物自体の酵素で加水分解され、構成成分である R3HB が菌体外へ放出される。従来、微生物を利用して R3HB を得るためには菌体内に蓄積された PHB を分解する必要があったが、我々は好気培養によって菌体内に PHB を蓄積するのと同時に R3HB を菌体外へ生産する *Halomonas* sp. OITC1261 株を見出している。一般的な PHB 生産菌は好気条件下では PHB を合成し、R3HB は菌体外へほとんど放出しないが、OITC1261 株は菌体内に蓄積する PHB を維持したまま R3HB を菌体外へ生産することができる。PHB を分解して R3HB を得る方法では前駆体となる PHB の量を菌体量以上には増やせないため R3HB の増産は容易ではないが、OITC1261 株は PHB の量に関わらず R3HB を生産することができる。本研究ではより効率的に R3HB を発酵生産するため、好気条件の違いによって OITC1261 株の生産性がどのような影響を受けるのか調べた。
【方法】卓上型培養装置を用いた培養試験では、培地 2L（スクロース及び硝酸ナトリウム、その他無機塩類で構成）に OITC1261 株を接種して好気培養した後、24 時間後に通気量や撹拌速度を変化させて生産量等への影響を比較した。すなわち、培養期間中好気条件を一定にした場合（通気量 5 L/min、撹拌速度 600rpm）と、途中で通気量を抑制した場合（5→1 L/min）、通気量と撹拌速度を抑制した場合（5→1 L/min、600→100rpm）の生産量等の経時変化を比較した。
【結果と考察】培養開始から 10 時間後には R3HB と PHB の生産が始まり、24 時間後の生産量はそれぞれ 14 g/L と 19 g/L だった。その後、一定の好気条件で培養した場合（72 時間後：R3HB=53 g/L、PHB=26 g/L）と比べて、通気量のみ抑制した場合は R3HB と PHB の生産量が 2～3 割少なかった。また、通気量と撹拌速度を抑制した場合の R3HB 生産量は通気量のみ抑制したときと同程度だった。一方で PHB は 24 時間時点よりも減少していたことから、嫌気的な条件になったことでポリマーの分解速度が合成速度を上回り、分解によって生じた R3HB が菌体外に放出されたことが示唆された。

3-hydroxybutyric acid, *Halomonas* sp., aerobic fermentation

発表責任者：世嘉良宏斗（yokryouh@pref.okinawa.lg.jp）

講演番号：3J28p10
講演日時：3 月 19 日 16:25～ J 校舎 28 会場

# 発酵（*R*）-3-ヒドロキシ酪酸を用いて化学合成したポリ-3-ヒドロキシ酪酸の生分解

# Biodegradation of chemically synthesized poly-3-hydroxybutyrate using fermented (*R*)-3-hydroxybutyric acid

○常盤 豊[1]、中山 敦好[1]、楽 隆生[2]、世嘉良 宏斗[3] ([1]産総研、[2]甲南化工、[3]沖縄県工技セ)
○Yutaka TOKIWA[1], Atsuyoshi NAKAYAMA[1], Takao RAKU[2], Hiroto YOKARYO[3] ([1]AIST, [2]Konan Chemical, [3]OITC)

【背景】最近、海のごみが海洋生態系に脅威であるとして世界的な課題となり、サミット首脳宣言にも取り上げられている。海洋ゴミの約 70%をプラスチックが占めている。特に、通常のプラスチックが壊れて 5 mm 以下になった細片や、洗顔料、練り歯磨き等に使われている微小なプラスチックビーズが、マイクロプラスチック問題として注目されている。マイクロプラスチックは、海水中の PCB 等の有害有機物を吸着・濃縮し、魚などの生物の体内に取り込まれた後、食物連鎖による人への影響が懸念されている。

微生物が作るポリ-3-ヒドロキシ酪酸（PHB）は、海洋などの自然界でも分解しやすい生分解性プラスチックとして知られており、マイクロプラスチック問題を解決する一つの切り札として期待される。しかし、微生物が作る PHB は、生産費が高いということだけでなく、微生物由来の不純物を含むなどの問題があり、未だ広く普及していない。

私たちは、*Halomonas* sp. OITC1261 株が菌体の外に生産し、精製が容易な(*R*)-3-ヒドロキシ酪酸（R3HB）を用いて、高純度の PHB を化学合成してその生分解性を調べた。

【方法】*Halomonas* sp. OITC1261 株が生産した発酵 R3HB は、液クロで純度 99%以上、光学純度 98.6%ee の標品を用いた。PHB の化学合成は、*p*-トルエンスルホン酸を触媒に用いて、R3HB をトルエン中で脱水重合することにより行った。また、数モル%のエチレングリコールを添加して同様に脱水重合して、両末端がヒドロキシ基である PHB も調製した。化学合成した PHB の生分解性は、好熱性の *Streptomyces* sp. MG 株が生産する PHB 分解酵素[1)] と BOD テスター200F を用いて海水により評価した。

【結果と考察】高純度の R3HB を用いて化学合成した PHB は、好熱性 PHB 分解酵素により加水分解された。PHB 分解酵素による加水分解速度は、界面活性剤の種類により、変化することが分った。また、カルボキシル基を持つ PHB は、両末端がヒドロキシ基の PHB に比べて、酵素分解性が低下した。さらに、微生物由来の不純物を含まない化学合成した PHB は、海水中でも生分解されることが明らかになった。

1) B.P. Calabia, Y. Tokiwa, *Biotechnol. Lett*. **28**, 383-388 (2006)

(R)-3-hydoxybutyric acid, poly-3-hydroxybutyrate, biodegradation

発表責任者：常盤豊（y.tokiwa@aist.go.jp）

講演番号：3J28p11
講演日時：3 月 19 日 16:50～ J 校舎 28 会場

脱脂米糠からのリン・タンパク質抽出条件の最適化による回収産物の品質に与える影響
Influence on quality of recovered products due to optimization of phosphorus and protein extraction from defatted rice bran.
○玉田 陽集[1]、遠藤 修二郎[2]、渡辺 昌規[1] ([1]山形大院農、[2]三和油脂株式会社)
○Youshu TAMADA[1], Shujirou ENDO[2], Masanori WATANABE[1] ([1]Yamagata Univ., [2]Sanwa yushi co.ltd.)

【背景・目的】日本国内では年間約７５０万トンの籾が収穫され、精米工場等で扱われる米糠は約６０万トンに相当する。米糠は、米油製造時の原料として使用されているが、米糠中の油脂含有量は２０％以下と低いため、著量の脱脂米糠が新たに副生する。脱脂米糠は一部で飼料等に利用されているものの、そのほとんどは有効利用されることなく廃棄されている状況にある。一方、米糠にはタンパク質、脂質、ビタミン、食物繊維、フィチン酸等の機能性成分が豊富に含まれていることが知られており、新たな利活用方法が求められている。これらを背景に、当研究室では脱脂米糠に含有するリン・タンパク質の量成分を単一プロセスにより連続的に回収可能なプロセスを構築した。そこで本研究では、本プロセスの最適化による回収タンパク質含量および回収率の向上について、それぞれ検討を行った。
【方法・結果】脱脂米糠に含有するリン酸等のイオン性物質は弱酸性処理による可溶化、弱アルカリ処理による不溶性リン酸塩の形成により、糠中のリン成分の回収・除去を行った。その際に得られた上清画分と前述の酸不溶性画分を混合後、アルカリ処理によりタンパク質可溶性画分を回収し、さらに等電点沈殿・電解水洗浄により精製タンパク質画分を得た。脱脂米糠からのタンパク質抽出条件の最適化を行った結果、抽出時ＮａＯＨ濃度・時間はそれぞれ、１．５％、１２０分であった。それに対し、タンパク質回収条件の最適化を行ったところ、抽出時ＮａＯＨ濃度は、０．８％と異なる結果を示すとともに、タンパク質含有率、タンパク質回収率も、上記抽出条件の場合と比べ、それぞれ約８％、約１１％の増加が認められた。これらの結果より、最適化された抽出条件により得られたタンパク質は部分的な加水分解により沈降性画分として効率的な回収が困難になっていると考えられた。また、タンパク質抽出後に生じる残渣画分からのタンパク質抽出を試みた結果、タンパク質抽出時のＮａＯＨ濃度の低下により、残渣画分からのタンパク質の回収量が増大する傾向が認められた。このことは、低イオン強度下におけるタンパク質の水和容量の上昇によるタンパク質の溶媒に対する溶解度の向上が起因しているものと推察された。

defatted rice bran, rice protein, phosphorus compounds

発表責任者：渡辺昌規（mwata@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp）

講演番号：3J28p12
講演日時：3 月 19 日 17:05～ J 校舎 28 会場

# 木質バイオマス減容化に向けた樹皮糖化産物のメタン発酵阻害に関する研究

# Study on inhibitory effect of saccharified solution of woody bark on methane fermentation

○尾藤 真衣[1]、大塚 祐一郎[2]、中村 雅哉[2]、中島田 豊[3]、新谷 政己[1]、金原 和秀[1] ([1]静大工、[2]森林総研、[3]広大院先端)
○Mai BITO[1], Yuichiro OTSUKA[2], Masaya NAKAMURA[2], Yutaka NAKASHIMADA[3], Masaki SHINTANI[1], Kazuhide KIMBARA[1] ([1]Shizuoka Univ., [2]FFP Res. Inst., [3]Hiroshima Univ.)

【目的】現在、福島では放射性物質で汚染されたバイオマスの減容化が急務とされている．本研究は，環境負荷の大きい焼却処分ではなく，減容化しながらエネルギーを生産するバイオプロセスの開発を目的として，湿式ミリング法を用いた木質バイオマスの微粉化糖化処理と，糖化液を処理する上向流嫌気性汚泥床(UASB)メタン発酵の確立を目指して実験を行った．湿式ミリング法は，ビーズミルによる物理的な破砕と，糖化酵素による生物学的な分解を同時に行うことで短時間での処理が可能となる．また，特に処理が必要とされる木質バイオマスは，心材部分に比べ樹皮部分の方が処理量が多い．しかし樹皮にはタンニンと呼ばれる複雑な構造を有する芳香属化合物が含まれている．タンニンは酵素阻害作用・殺菌効果を持つため，メタン発酵プロセスを阻害することが報告されている．そこで本研究では，樹皮に含まれるタンニンがメタン発酵にどのような影響を与えるかを調べた．
【方法】「湿式ミリングによる木質バイオマスの糖化」：サンプルは予めハンマーミルで平均粒径 20 μL に粉砕したバイオマス(スギの心材と樹皮)粉末 50 g に，超純水 435 mL，100 mM リン酸バッファー(pH5.5)5 mL を加え混合したものを用いた．湿式ミリングではジルコニア製ビーズ(φ0.5mm)を用いて小型湿式粉砕装置にて微粉砕(ミル周速 14m/sec)を行った．混合物を攪拌槽へ入れ，ポンプ(回転数 35 rpm)でベッセル部へ送液した．装置の循環を確認後，酵素（cellulase, xylanase, β-glucosidase mixture）10 mL を加え，120 分後スラリーを回収した．回収したスラリーを遠心し糖化液と固体残渣に分離した．「UASB メタン発酵」：容積 1.25 L のアクリル製 UASB 反応器を使用した．グルコースとスギ心材糖化液でグラニュールを馴養した後、濃度を 800 mg/L に維持した状態で樹皮糖化液の負荷を徐々に上げて供給した．経時的にガス生成量を水上置換法で，ガス組成をガスクロマトグラフィーで測定した．また有機酸の生成を HPLC で測定した．「スギ糖化産物を用いた汚泥による静置実験」：100 mL バイアル瓶に種汚泥 20 mL とサンプル 5 mL を添加し，窒素充填を行いブチルゴム栓で密封した．バイアル瓶は 50℃のインキュベーター内で静置し，経時的にガス生成量とガス組成を測定した．
【結果・考察】樹皮糖化液の負荷を徐々に上げて供給することで，メタン発酵システムは安定的に運転できることがわかった．このことからメタン発酵グラニュールを馴化させることで，樹皮糖化液に適応したメタン発酵が可能であると示唆された．また，樹皮糖化産物を用いた静置実験では，樹皮糖化産物がメタン発酵プロセスを阻害することが示唆された．

cedar bark, wet milling, UASB methane fermentation

発表責任者：金原和秀（kimbara.kazuhide@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3J28p13
講演日時：3 月 19 日 17:20～ J 校舎 28 会場

# 微細藻類ユーグレナにおけるワックスエステル分解酵素の同定

# Identification of wax esterase in phytoflagellate *Euglena gracilis*

○石川 孝博[1,2]、栗原 佳恵子[1,2]、小川 貴央[1,2]、丸田 隆典[1,2]、澤 嘉弘[1]、森 大[3,4]（[1]島大生資科、[2]JST/CREST、[3]慶大先端生命、[4]慶大政策メディア）
○Takahiro ISHIKAWA[1,2], Kaeko Kurihara[1,2], Takahisa Ogawa[1,2], Takanori Maruta[1,2], Yoshihiro Sawa[1], Masaru Mori[3,4] ([1]Shimane Univ., [2]JST/CREST, [3]Keio Univ., Inst., Adv., Biosci., [4]Keio Univ., SFC)

微細藻類 *Euglena gracilis* は嫌気条件下において、貯蔵多糖パラミロン（β-1,3-グルカン）から発酵経路により最終的にバイオ燃料としての利用が期待されるミリスチルミリスチン酸(C28)を主成分とするワックスエステルを合成する。このワックスエステルは、嫌気状態の細胞が再び好気状態に戻ることで短時間に分解されるが、そのメカニズムは不明である。本研究では、好気特異的に機能するワックスエステル分解酵素の同定を試みた。ワックスエステル発酵調節機構解析の過程で実施したリン酸化プロテオームデータにおいて、嫌気条件から好気条件に移行した際にリン酸化レベルが有意に増加するペプチドクラスターの中に、トリアシルグリセロールリパーゼ様タンパク質(TGL)を見出した。*E.gracilis* の野生株では、嫌気から好気条件に移行後 6 時間までに約 80%の C28 が分解されたが、二本鎖 RNA を導入した TGL 遺伝子発現抑制株では、C28 の分解が顕著に抑制されたことから、TGL が好気条件におけるワックスエステル分解酵素であることが強く示唆された。

Euglena gracilis, Wax ester, Esterase

発表責任者：石川孝博（ishikawa@life.shimane-u.ac.jp）

講演番号：3J28p14
講演日時：3 月 19 日 17:35～ J 校舎 28 会場

# リン酸化プロテオーム解析を用いたワックスエステル代謝制御機構の解明

# Analysis of wax ester metabolism in *Euglena* by phosphoproteomics

○木村 光宏[1]、森 大[2,3]、石川 孝博[1] ([1]島大生資科、[2]慶大先端生命、[3]慶大政策メディア)
○Mitsuhiro KIMURA[1], Masaru MORI[2,3], Takahiro ISHIKAWA[1] ([1]Shimane Univ., [2]Keio Univ., Inst., Adv., Biosci., [3]Keio Univ., SFC)

微細藻類ユーグレナ(*Euglena gracilis*)は、嫌気条件下で貯蔵多糖パラミロン（β-1,3-グルカン）をグルコース単位に分解し、バイオ燃料に有用なワックスエステルを合成する。これまでの解析より、嫌気条件に応答したワックスエステル代謝制御は、関連する酵素遺伝子やタンパク質の発現調節ではなく、翻訳後修飾による可能性が示唆されている。プロテインキナーゼ阻害剤である K252a 処理により、嫌気処理 3 時間後のワックスエステル蓄積は著しく抑制されたことから、本研究ではリン酸化修飾に着目し、リン酸化プロテオーム解析を用いたワックスエステル代謝経路に関与する因子の探索を試みた。

嫌気処理 3 時間および 24 時間後、嫌気 24 時間後に好気条件に戻したユーグレナ細胞をそれぞれ用いてリン酸化プロテオーム解析を行った結果、嫌気条件下で 1,911 ペプチド（487 タンパク質）が有意差（$p<0.05$）を持って変動していた。これらのタンパク質には 26 種類のプロテインキナーゼが含まれており、RNAi 系統の解析から 2 種類がワックスエステル代謝経路を抑制し、1 種類が促進することが示唆された。ワックスエステル代謝経路を抑制するプロテインキナーゼの一つは脂質代謝への関与が報告されている DYRK ファミリーキナーゼ、STD1（STarch Degradation 1）オーソログであった。現在、STD1 を含めたプロテインキナーゼのワックスエステル代謝に及ぼす影響を検討しており、さらに、ワックスエステル代謝経路を促進するプロテインキナーゼの RNAi 系統を用いたリン酸化プロテオーム解析から標的因子の候補を探索している。

*Euglena*, wax ester metabolism, phosphoproteomics

講演番号：3J28p15
講演日時：3 月 19 日 17:50～ J 校舎 28 会場

# ヘミセルロースのマウスの脂質代謝への影響

# Effect of hemicellulose on lipid metabolism in mice.

○布施 有里奈[1]、椎葉 究[1,2]、小島 俊佑[1]、関本 智登[1]、堀内 美穂[1]、前村 美樹[1] ([1]東京電機大学理工学部、[2]東京電機大学)
○ Yurina FUSE[1], Kiwamu SHIIBA[1,2], Syunsuke KOJIMA[1], Tomotaka SEKIMOTO[1], Miho HORIUCHI[1], Miki MAEMURA[1] ([1]Tokyo Denki University Faculty of Science and Engineering, [2]Tokyo Denki Univ)

［目的］
孟宗竹は増殖力が強く、ホモセルロース成分含有量が高いため有望なバイオマス資源として注目されている。当研究室では竹から効率的なバイオエネルギー生産について研究を行い、発表してきた。しかし、バイオマスエネルギー生産コストがまだ高く、バイオリファイナリの観点から竹の有価物の探索を行ってきた。竹から抽出調製した竹ヘミセルロース加水分解物（以下ＢＯＳ）を高脂肪食と配合して与えた場合と高脂肪食のみを与えた場合を比較してＢＯＳがコレステロール代謝に与える影響について報告した[(1)]が、今回、肝コレステロールに及ぼす影響について再検討した。
［実験方法］
竹チップに蒸留水を加え１２１℃で２０分高圧処理した後、セルラーゼを加えて６０℃でセルラーゼ処理することで竹チップを糖化させ、採取した液体を乾燥することでＢＯＳを作製した。Ｃ５７ＢＬマウスを高脂肪食餌のみを与えるグループと高脂肪食餌に５％のＢＯＳを混ぜたものを与えたグループの２グループに分け、４週間の給餌を行ってマウスの血中コレステロール濃度を測定し、血中コレステロールの測定が終了した後頸椎脱臼して致死させ、解剖して肝臓を採取して肝コレステロール濃度を測定した。肝コレステロール濃度の測定は Total Cholesterol and Cholesteryl Ester Colorimetric/Fluorometric Assay Kit　K603-100（Bio Vision 製）を使用して測定した。
［結果と考察］

1. 5%ＢＯＳ混合餌グループ(以下テスト区)では高脂肪餌のみを与えたグループ(以下コントロール区）と比較して体重増加が抑えられていた。
2. コレステロール測定の結果、テスト区で血中コレステロールの減少とテスト区での肝コレステロールの減少がみられた。
3. 解剖の結果、コントロール区にて体脂肪の付き方が低い傾向が認められた。
4. 糞便色の違いがあり、テスト区では pH が低く検出された。

以上から、腸内細菌の作用によるコレステロール代謝へのプラスの影響が示唆された。

(1) M.MAEMURA, M.HORIUCHI, T.ABE and K. SHIBA (2016) Preparation of Bamboo Hemicellulose Hydrolysate Possesing Anti-oxidative Proprerties and Their Effects on Mice Plasma Cholesterol. Food Science and Technology Research, 22(4):537-543.

bamboo, lipid metabolism, hemicellulose

講演番号：3J28p16
講演日時：3 月 19 日 18:05～ J 校舎 28 会場

# 孟宗竹からの抗酸化能を有するオリゴ糖の単離と構造解析

# Isolation and structural analysis of anti-oxidant oligosaccharides from Moso bamboo

○関本 智登[1]、前島 裕太[2]、椎葉 究[1,2] ([1]東京電機大学大学院、[2]東京電機大学)
○Tomotaka SEKIMOTO[1], Yuuta MAESHIMA[2], Kiwamu SHIIBA[1,2] ([1]Graduate School of Tokyo Denki Univ., [2]Tokyo Denki University.)

[目的]

これまで当研究室では、孟宗竹から低コストでバイオエタノール生産技術の開発に関する研究を行なってきた。この過程で副産物として得られるヘミセルロース加水分解物(BOS)が、マウスの血しょうコレステロール上昇抑制効果を有すること、高い抗酸化能を持つことを見い出し、それについて報告した[1)]。しかしながら、BOS 中のこれらの生理活性効果を有するオリゴ糖の化学構造や特性についての相関性は得られていない。そのため本研究では、孟宗竹から抽出した BOS 中に含まれるオリゴ糖を単離し、その化学構造についての検討を行なった。

[方法]

・孟宗竹の粗粉砕物に高温高圧処理を行なった後、セルラーゼで酵素処理し、固液分離により得られたろ液を BOS (Bamboo oligo-saccharides)として回収し、凍結乾燥を行ない粉末状にした。
・BOS 中に含まれる抗酸化能を有するオリゴ糖を,SephadexLH-20 を用いたバッチ法により分画した。この分画物を HPLC ゲルろ過カラムで RI 検出器と UV325nm により測定し、BOS に含まれるオリゴ糖の分子量分布を測定した。
・その後さらに AmberliteXAD-2 やシリカゲルによるカラムクロマトグラフィー、分取 TLC などを用いて精製を行なった。
・各精製段階における抗酸化物質量を、フェノール硫酸法による全糖量と DPPH フリーラジカル消去法による抗酸化能の測定を行なうことで評価した。
・単離されたオリゴ糖(抗酸化物質)を、LC/MS により構造解析を行なった。

[結果および考察]

①SephadexLH-20 で分画後、HPLC で測定した分子量分布から、抗酸化能を持つオリゴ糖はメインピークで分子量約 700Da であることが分かった。またそのオリゴ糖はフェルラ酸を含むことが分かった。
②フェルラ酸を含むオリゴ糖を Amberlite やシリカゲルで精製し、TLC で展開したところ、大きく 2 種類のオリゴ糖が確認された。
③LC/MS 分析から、分子量 812Da のオリゴ糖が存在していることが示唆された。

1)Miki MAEMURA et al.,Food Science and Technology Reserch,22 (4),537-543 (2016)

Antioxidant, Oligosaccharide, Ferulic acid

講演番号：3J29a01
講演日時：3 月 19 日 09:20～ J 校舎 29 会場

# 1,5-結合したβ-L-アラビノフラノシドを有するオリゴアラビノフラノシドの合成と構造解析

# Synthesis and structural analysis of oligoarabinofuranosides with 1,5-linked ß-L-arabinofuranoside

○石渡 明弘、伊藤 幸成（理研）
○Akihiro ISHIWATA, Yukishige ITO (RIKEN)

【目的】植物のオリゴ糖鎖の中には、β-L-アラビノフラノシド (β-L-Ara*f*) を含む構造が見いだされている。β-L-Ara*f* は種々の結合様式でアグリコン部と結合しているが、オリーブや渦鞭毛藻においては非還元末端、又は繰り返し構造のオリゴマーとして、β-L-Ara*f*-(1→5) 結合が提唱されている。β-L-Ara*f* 構造は、最近、*Bifidobacterium longum*より見いだされた β-L-Ara*f* 加水分解酵素の基質構造として重要であり、その立体選択的合成研究を展開している。酵素の類縁体解析にて種々の結合様式を切断するβ-L-Ara*f* 加水分解酵素の存在が示唆される中、まだ分解酵素が見いだされていない 1,5-結合を有する糖鎖構造に絞り、立体選択的化学合成及び提唱構造の構築と構造解析をおこなったので報告する。
【方法と結果】糖鎖合成における鍵反応であるグリコシル化の中で、1,2-*cis*-β-Ara*f* の構築は、立体制御が困難である。当研究室で開発した 2-naphthylmethyl (NAP) エーテルを介した分子内アグリコン転移反応 (IAD) を鍵反応として応用し、種々の植物由来 β-L-アラビノフラノシド構造の構築検討をおこなうことした。L-アラビノースより調製した２位に NAP 基を有する Ara*f* 供与体を用い、同様に L-アラビノースより調製した５位にヒドロキシ基を有する糖受容体と NAP エーテルを介し混合アセタールとして接続した後に、分子内でアグリコンを立体選択的に転移し、β-グリコシド構造を構築する検討をおこなった。その結果、β-L-Ara*f*-(1→5)-L-Ara*f* 構造を立体選択的に構築できることを見いだした。オリーブ由来のフラグメントとして非還元末端二糖および さらに α-L-Ara*f*-(1→3)-L-Ara*f* 構造を有する分岐三糖をそれぞれ構築し、構造解析をおこなった。その結果、いずれの場合も、類似のパターンの HMQC スペクトルとなり、完全な一致でないものの、良い一致を示した。合成したフラグメントは多糖のように繰り返し構造を持たないが、直接分岐した構造の影響は受けるものの、内部構造の影響が少なくスペクトルが良い一致を示したものと考えている。次に渦鞭毛藻由来オリゴマー構造の構築について、 NAP エーテルを介した IAD を繰り返しおこない、立体選択的に三糖構造の構築をおこなった。詳細な構造解析の結果についても合わせて報告したい。

参考文献

1) a. Ishiwata, A. et al. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 4250; b. Ishiwata, A. et al. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 3596.
2) a. Kaeothip, S. et al. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 4250; b. Kaeothip, S., et al., *Carbohydr. Res.* **2013**, 382, 95.
3) Ishiwata, A. et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 9812

Stereoselective glycosylation, Plant oligosaccharide, Intramolecular aglycon delivery

発表責任者：石渡明弘（aishiwa@riken.jp）

講演番号：3J29a02
講演日時：3 月 19 日 09:35～ J 校舎 29 会場

# チオエーテル基を持つ糖受容体を用いた立体選択的グリコシル化

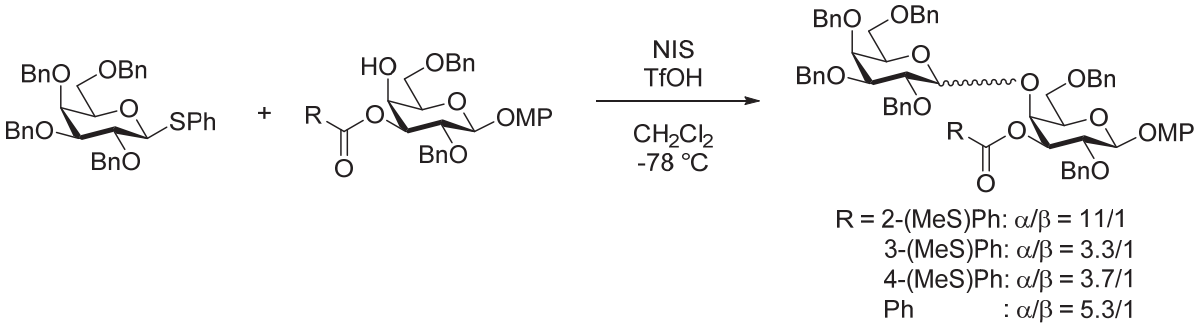
# Stereoselective glycosylation using glycosyl acceptor thioether groups

○土肥 博史[1,2]、小林 真己[3]、前川 丈武[1]、西田 芳弘[2,3]（[1]千葉大院園芸、[2]千葉大・分子キラリティー研究センター、[3]千葉大院融合）

○ Hirofumi DOHI[1,2], Masaki KOBAYASHI[3], Hiromu MAEGAWA[1], Yoshihiro NISHIDA[2,3] ([1]Graduate School of Horticulture, Chiba Univ., [2]Molecular Chirality Research Center, Chiba Univ., [3]Graduate School of Advanced Integration Science, Chiba Univ.)

近年のグリコシル化法の発展により種々の生理活性糖鎖の合成が可能となってきたが、依然として 1,2-*cis* 型グリコシドの構築は困難を伴う。現在までに様々な保護基を糖供与体に導入することでグリコシル化における 1,2-*cis* 選択性を向上させる手法が報告されてきたが、糖受容体の保護基による立体制御に関する報告例はほとんどない。以前我々は糖受容体の反応点近傍にチオエーテル系の保護基を導入することによって、グリコシル化反応において有意に 1,2-*cis* 選択性を向上させることを報告した。本研究では、さらに高い 1,2-*cis* 選択性を発現するチオエーテル系保護基の探索を目的として、（メチルチオ）ベンゾイル基を持つ糖受容体を合成し、様々な糖供与体とグリコシル化を行って立体選択性を調べた。

水酸基の近傍に *o*-, *m*-および *p*-（メチルチオ）ベンゾイル基、そしてベンゾイル基を持つ糖受容体をそれぞれ合成し、様々な糖供与体を用いてグリコシル化を行った。その結果、チオガラクトシドを糖供与体として用いた場合、*o*-（メチルチオ）ベンゾイル基を有する糖受容体は、*m*-および *p*-（メチルチオ）ベンゾイル体やベンゾイル体に比べて明らかに高い 1,2-*cis* 選択性を示した。またフッ化グリコシドに対するグリコシル化においては、プロモーターに $AgClO_4/SnCl_2$ を用いると各糖受容体の間で立体選択性に差がなかったのに対して、$AgOTf/HfCpCl_2$ を用いた場合はチオエーテルを有する糖受容体が高い 1,2-*cis* 選択性を示した。このことから糖受容体のチオエーテル部位はグリコシルトリフレート中間体に作用することで 1,2-*cis* 選択性を向上させているということが示唆された。チオグルコシドを糖供与体として用いた場合においても、チオエーテルを有する糖受容体は高い 1,2-*cis* 選択性を発現することがわかった。また、*o*-（メチルチオ）ベンゾイル基を有する糖受容体を用いて 1,2-*cis* グリコシドを持つ天然由来のオリゴ糖の合成を行った。




Glycosylation, Oligosaccharide, Stereoselectivity

発表責任者：土肥博史（hdohi@faculty.chiba-u.jp）

講演番号：3J29a03
講演日時：3 月 19 日 09:50～ J 校舎 29 会場

# 3'-シアリルラクトースを用いた糖鎖高分子の合成と機能評価

# Synthesis and assay of glycopolymer bearing 3'-sialyllactose

○田中 知成[1]、周 毅テイ[1]、田本 千尋[2]、紅林 佑希[2]、高橋 忠伸[2]、鈴木 隆[2] ([1]京工繊大院工芸、[2]静県大薬)
○Tomonari TANAKA[1], Yiting ZHOU[1], Chihiro TAMOTO[2], Yuuki KUREBAYASHI[2], Tadanobu TAKAHASHI[2], Tahashi SUZUKI[2] ([1]Kyoto Inst. Tech., [2]Univ. Shizuoka)

【目的】生体内のオリゴ糖鎖は、糖タンパク質や糖脂質などとして細胞表層に密集して存在することでレクチンなどの糖結合性タンパク質との相互作用が強くなることが知られており、これは“糖クラスター効果”と呼ばれている。合成高分子の側鎖に糖残基を配した糖鎖高分子は、糖クラスター効果を有する合成分子のひとつであるが、この合成は一般的に多段階で複雑な工程を必要とする。例えば、遊離糖から糖鎖高分子を合成するためには、ヒドロキシ基の保護、アノマー位の活性化、重合基の導入、脱保護を経て糖モノマーを合成した後、これを重合する方法が一般的である。また、カルボキシ基を有するシアル酸などヒドロキシ基以外の官能基を有する場合には、別途、カルボキシ基を保護・脱保護しなければならず、合成工程はますます煩雑となる。本研究では、トリインフルエンザウイルスのリガンドであるα2,3-シアリルガラクトシド構造を有する三糖、3’-シアリルラクトース(3’SALac)を原料として、保護基を使用することなく糖モノマーを合成した後、これを重合することで、側鎖に 3’SALac を有する糖鎖高分子を合成した。また、得られた糖鎖高分子のインフルエンザウイルスとの結合を評価した。

【実験と結果】3’SALac を水中、塩基存在下、脱水縮合剤 2-chloro-1,3-dimethylimidazolinium chloride (DMC)とアジ化ナトリウムを用いて反応することで、無保護 3’SALac のアノマー位をβ選択的にアジド化した。続いて、得られたグリコシルアジドを銅(I)触媒によるアジドーアルキン環化付加反応によって、*N*-プロパルギルアクリルアミドと反応することで、目的の糖アクリルアミド誘導体モノマーを得た。得られた糖モノマーは、DMSO 中、2,2'-azobis(4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitrile)を開始剤としてアクリルアミドと共重合反応することで、側鎖に SAα2,3Lac を有する糖鎖高分子が得られた。可逆的付加開裂連鎖移動(RAFT)重合により得られた糖鎖高分子の分子量分布は狭く、低分散なポリマーであった。合成した 3’SALac を有する糖鎖高分子を用いて、インフルエンザウイルスとの赤血球凝集阻止(HI)試験を行ったところ、トリ A 型ウイルス A/duck/Hong Kong/313/4/1978(H5N3)と強く相互作用することが確認できた。また、ヒト A 型ウイルス A/Memphis/1/1971(H3N2)とも同程度に結合することを HI 試験で確認した。さらに、合成した糖鎖高分子を金基板に固定化し、水晶発振子マイクロバランス(QCM)により結合評価したところ、HI 試験と同様の結果が得られた。以上の結果より、合成した SAα2,3Lac を側鎖に有する糖鎖高分子は、糖クラスター効果によってトリおよびヒト A 型インフルエンザウイルスと強く結合することが示唆された。

glycopolymer, sialic acid, influenza virus

発表責任者：田中知成（t-tanaka@kit.ac.jp）

講演番号：3J29a04
講演日時：3 月 19 日 10:05～ J 校舎 29 会場

# インフルエンザウイルスの種間伝播機構解明を可能にする異種抗原型糖鎖プローブの開発

# Synthesis of multivalent Neu5Gc-glycoclusters as probes to elucidate the mechanism of interspecies transmission of influenza virus.

○尾形 慎[1]、大坪 忠宗[2]、池田 潔[2]、加藤 竜也[3]、朴 龍洙[3]、山中 隆史[4]、左 一八[5]（[1]福島高専・物質工、[2]広島国際大・薬、[3]静岡大・グリーン科技研、[4]JRA、[5]会津大・短）

○Makoto OGATA[1], Tadamune OTSUBO[2], Kiyoshi IKEDA[2], Tatsuya KATO[3], Enoch Y. PARK[3], Takashi YAMANAKA[4], Kazuya I.P.J. HIDARI[5] ([1]NIT, Fukushima College, [2]Hiroshima International Univ., [3]Shizuoka Univ., [4]JRA, [5]Univ. of Aizu)

【目的】

糖鎖と糖結合性タンパク質（レクチン）との相互作用は、生体内のさまざまな生物学的プロセスにおいて非常に重要な役割を担っている。一般的に、これら異分子間の一対一の相互作用は構造特異的ではあるが、その結合親和性は弱いことが知られている。自然界では、これら微弱な相互作用を増強する手段として糖鎖クラスター効果と呼ばれる多価性相互作用を介した現象が見られる。近年我々は、この現象が関与するインフルエンザウイルス（IFV）のヘマグルチニン（HA）を介したウイルス感染に着目し、*N*-アセチルノイラミン酸（Neu5Ac）を高分子骨格上に多価導入（糖鎖クラスター化）することで HA に対する結合親和性を飛躍的に高めた IFV 検出用プローブの開発に成功している[1-3]。

本研究では、Neu5Ac 含有糖鎖プローブの合成手法を基盤として異種抗原型糖鎖｛*N*-グリコリルノイラミン酸（Neu5Gc）｝を多価導入した新規糖鎖プローブの合成を行った。さらに、これら Neu5Gc 含有糖鎖プローブのウマインフルエンザウイルス（EIV）に対する結合親和性を赤血球凝集抑制試験にて評価した。

【方法および結果】

初めに、従来法[1)]に基づいて調製したラクトース含有糖鎖ポリペプチドを糖受容体、有機化学的に合成した CMP-β-Neu5Gc を糖供与体、カイコ-バクミドシステムによって異種発現させたラット由来 α2,3-シアリルトランスフェラーゼを酵素源に用いることで、Neu5Gcα2,3lactose 含有糖鎖ポリペプチドの酵素合成に成功した。$^1$H NMR 法を用いた Neu5Gc 転移率分析により、アシアロ型糖鎖ポリペプチドの非還元末端ガラクトース残基の 3 位ヒドロキシ基への定量的な Neu5Gc 転移を確認した。次に、Neu5Gcα2,3lactose 含有糖鎖ポリペプチドを用いて EIV に対する赤血球凝集抑制試験を試みた。その結果、使用した 3 株全ての A 型 EIV｛Ibaraki07（H3N8）、Yokohama10（H3N8）、Richmond07（H3N8）｝に対して赤血球凝集抑制反応が観察された。さらに、別途合成したシアル酸種やシアル酸の結合位置、内部糖鎖構造の異なる種々のシアル酸含有糖鎖ポリペプチドを用いて、EIV に対する構造活性相関の評価を行った。その結果、本糖鎖ポリペプチドが IFV-HA のシアル酸種認識特異性を評価する新規プローブとして利用可能であることを実証した。

【参考文献】

1) M. Ogata, T. Murata, K. Murakami, T. Suzuki, K.I. Hidari, Y. Suzuki, T. Usui, ***Bioorg. Med. Chem.,*** *15*, 1383-1393 (2007).
2) M. Ogata, K. I. Hidari, W. Kozaki, T. Murata, J. Hiratake, E. Y. Park, T. Suzuki, T. Usui, ***Biomacromolecules***, *10*, 1894-1903 (2009).
3) T. Takahashi, T. Kawakami, T. Mizuno, A. Minami, Y. Uchida, T. Saito, S. Matsui, M. Ogata, T. Usui, N. Sriwilaijaroen, H. Hiramatsu, Y. Suzuki, T. Suzuki, ***PLoS ONE***, *8*, e78125 (2013).

carbohydrate, cluster effect, influenza virus

発表責任者：尾形慎（ogata@fukushima-nct.ac.jp）

講演番号：3J29a05
講演日時：3 月 19 日 10:20～ J 校舎 29 会場

# 酵母を発現宿主とした組換え糖タンパク質の調製と Endo-M による糖鎖構造の均一化

# Preparation of recombinant glycoproteins using yeast as a host and homogenization of the sugar chain structure by Endo-M

○苫米地 祐輔[1]、加藤 紀彦[1,2]、坂口 広大[1]、千葉 靖典[3]、熊田 純一[4]、松崎 祐二[4]、山本 憲二[1] ([1]石川県大・生資工研、[2]京大院・生命、[3]産総研・創薬基盤、[4]東京化成工業)

○Yusuke TOMABECHI[1], Toshihiko KATOH[1,2], Kouta SAKAGUCHI[1], Yasunori CHIBA[3], Junichi KUMADA[4], Yuji MATSUZAKI[4], Kenji YAMAMOTO[1] ([1]Ishikawa Prefectural Univ., [2]Kyoto Univ., [3]AIST, [4]TCI)

Endo-β-*N*-acetylglucosaminidase（ENGase）は、糖タンパク質や糖ペプチドのアスパラギン結合型糖鎖のキトビオース部分に作用し、タンパク質やペプチドに 1 残基の *N*-acetylglucosamine を残して糖鎖を遊離するエンド型酵素である。私たちは土壌より単離同定した糸状菌 *Mucor hiemalis* 由来の ENGase（Endo-M）が、加水分解活性のみならず、糖やアルコールなどの水酸基を持つ化合物に糖ペプチド、糖タンパク質より遊離した糖鎖を丸ごと転移付加する糖転移活性をも有するユニークな酵素であることを見出している。近年、本酵素はその特異な糖転移活性を利用してバイオ医薬品を創出するツールとして期待されている。抗体医薬を中心としたバイオ医薬品の多くは糖タンパク質性医薬品であり、その糖鎖はタンパク質の安定性、溶解性、生理活性などの薬効に重要な役割を果たしていることが明らかになって来た。しかし、一般的に真核細胞を用いて生産される糖タンパク質の糖鎖構造は著しく不均一であり、その糖鎖構造の違いが製品間の品質の違いを生じさせる可能性が指摘されている。そのため糖タンパク質性医薬品の糖鎖構造を均一に制御する技術が強く求められている。

私たちは Endo-M を用いて、組換えヒト免疫グロブリン G (IgG)をモデル糖タンパク質として糖鎖のリモデリングを行った。すなわち、メタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* を宿主として発現させた組換えヒト IgG について、結合している酵母型の高マンノース型糖鎖を Endo-M を用いてヒト型のシアロ複合型糖鎖に変換することを検討した（図 1）。まず、組換えヒト IgG に Endo-H を作用させたところ、ヒト IgG の重鎖の低分子化が見られ、糖鎖が切断されたことを確認した。次にシアロ複合型二本鎖糖鎖を有する卵黄由来糖ペプチドあるいはシアロ複合型二本鎖のオキサゾリン型糖鎖を糖鎖供与体として Endo-M N175Q（グリコシンターゼ様変異体）を用いて酵素反応を行いウェスタンブロッティングによる確認の結果、組換え IgG の分子量の増加が見出された。さらにシアル酸を認識する SNA レクチンを用いたブロッティングによってもシアロ糖鎖が付加されたことが確認され、これらの結果から酵母で生産した組換え IgG 糖鎖のヒト型糖鎖へのリモデリングに成功した。また、Endo-M を用いてメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を発現宿主として調製したヒトインターフェロン γの糖鎖の均一化も試みたので併せて報告する。

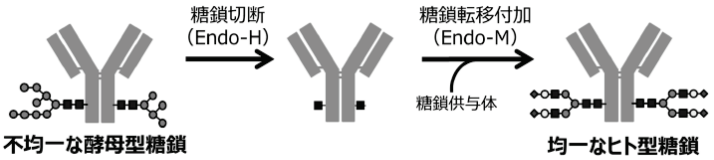



図 1 Endo-M による組換え IgG 糖鎖のヒト型糖鎖への改変

Endo-M, yeast, glycoprotein

発表責任者：山本憲二（yamamotk@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：3J29a06
講演日時：3 月 19 日 10:45～ J 校舎 29 会場

# ピロリ由来α1,3-フコース転移酵素のシアリルラクトサミン基質への特異的糖転移反応

# Unique reaction of immobilized 1,3-fucosyltransferase from *H. pylori* for sialyllactosaminides

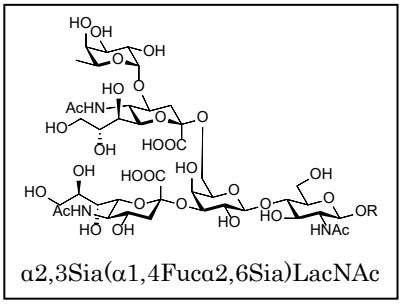
○清水 弘樹[1]、長島 生[1]、作田 智美[1]、蟹江 善美[2]、蟹江 治[2]([1]産総研生物プロセス、[2]東海大先進生命科学)
○Hiroki SHIMIZU[1], Izuru NAGASHIMA[1], Tomomi SAKUTA[1], Yoshimi KANIE[2], Osamu KANIE[2]
([1]AIST, BPRI, [2]Tokai Univ., Inst. Adv. Biosci.)

糖鎖はタンパク質や核酸などと同じく生命情報分子として注目され、糖鎖科学研究が盛んであるが、糖鎖化学研究の寄与無しには今後の研究展開は難しい。

生命科学研究分野において、構造の多様性や多岐にわたる機能発現誘導活性などから、糖鎖は難しい研究対象のひとつである。そのため、糖タンパクにおける糖鎖部分は考慮せず、タンパク鎖のみに着目した機能解析研究や創薬研究などが展開されることも多い。しかし糖鎖機能に目を瞑るといつまでも生命現象の全解明にはつながらない。この懸念を打破するためには、任意の糖鎖を合成し生化学的研究分野に利用するといった、糖鎖化学研究の発展と連携がカギとなることは疑いの余地がない。実際、抗体医薬研究や生物製剤の改良医薬であるバイオベター開発研究では、糖タンパクの糖鎖構造画一化によりその達成を目論むなど、糖鎖化学研究の推進は必要不可欠となっている。

糖鎖合成研究は半世紀近くに渡り盛んに研究され、近年では有機化学合成的手法により非天然型を含め合成できない糖鎖は無いといっても過言ではない。かといって、糖鎖化学研究が無事終焉を迎えたわけでは全くない。化学合成法では、ヒドロキシル基の選択的保護と脱保護、グリコシル化反応における隣接基関与やアノマー効果等を利用した反応制御など専門的な技術が要求され、その結果長い工程数が必要となる。すなわち、糖鎖が汎用的に合成されうるとはまだまだ言い難い状況である。一方、酵素反応では酵素の基質特異性を利用することから、化学法で要求された長い化合物変換行程を経ることなく、高選択的にグリコシル化反応を進行させることができる。そこで我々は、この両者を組み合わせたケモエンザイマティックな糖鎖合成法について研究を進めている。

我々は 2010 年本会一般講演や 2013 年本会シンポジウムなどおいて、天然由来のリコンビナント糖転移酵素を用いた非天然型の糖鎖合成研究について発表した。その中で、α2,3SiaLacNAc やα2,6SiaLacNAc、非天然型の α2,3Sia(α2,6Sia)LacNAc などにピロリ由来 α1,3-フコース転移酵素を作用させたところ、それぞれ天然型の 2,3SiaLeX や非天然物である 2,6SiaLeX、2,3:2,6diSiaLeX が得られたと報告した。しかしこれらの産物を NMR 構造解析や質量分析解析などにより精査したところ、2,3SiaLeX は正しく得られていたが、α2,6SiaLacNAc や α2,3Sia(α2,6Sia)-LacNAc に対する本フコシル化反応は、本来の基質特異性に沿った GlaNAc3 位にではなくシアル酸部 4 位に起こっていたことが判明した。



α2,3Sia(α1,4Fucα2,6Sia)LacNAc

glycochemistry, glycosyltransferase, carbohydrate

発表責任者：清水弘樹（hiroki.shimizu@aist.go.jp）

講演番号：3J29a07
講演日時：3 月 19 日 11:00～ J 校舎 29 会場

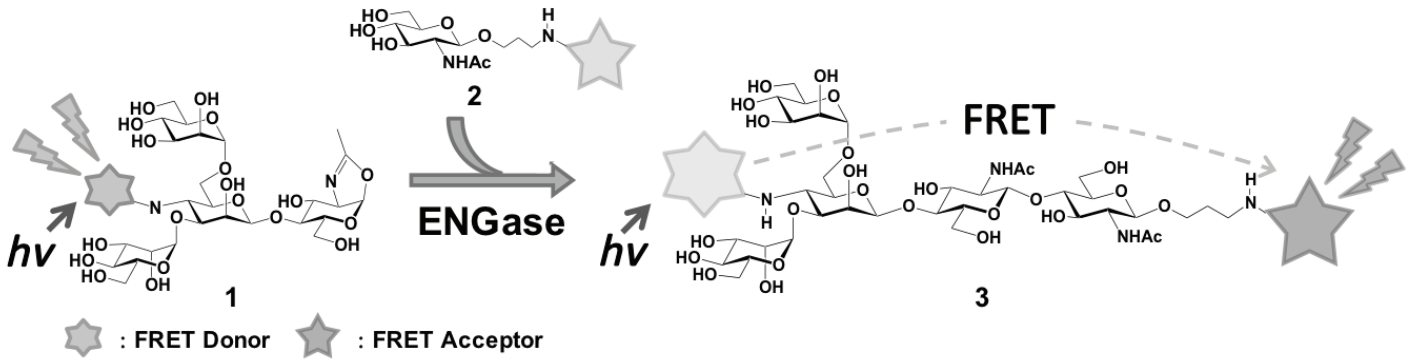
# ENGase の糖転移活性を検出するための糖鎖プローブの合成

# Synthesis of glycan probe for evaluating the transglycosylation activity of ENGase

○石井 希実[1]、須永 千恵[1]、佐野 加苗[1]、吉村 弥生[1]、熊田 純一[2]、松崎 祐二[2]、松尾 一郎[1]([1]群馬大院理工、[2]東京化成工業株式会社)
○Nozomi ISHII[1], Chie SUNAGA[1], Kanae SANO[1], Yayoi YOSHIMURA[1], Jyunichi KUMADA[2], Yuji MATSUZAKI[2], Ichiro MATSUO[1] ([1]Gunma Univ., [2]TCI)

均一な糖鎖構造を持つ糖タンパク質や人工糖タンパク質を合成する手法としてエンド-*β*-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ(ENGase)の糖転移活性を利用した化学-酵素合成法が注目されている[1]。また、効率的に糖鎖を転移するために ENGase の触媒残基に変異を導入することで加水分解活性を抑え、転移効率を高めた改変体酵素（グライコシンターゼ）の作製が盛んに行われている[2]。しかし、糖転移活性の高い改変型 ENGase をスクリーニングするためには、糖転移反応を簡便に検出する手法が必要である。そこで、本研究では蛍光を発する FRET 原理に基づいた糖転移活性の検出法を構築した。

ENGase の糖供与体基質として、アスパラギン結合型糖鎖のコア構造である $Man_3GlcNAc$ 骨格にアミノ基を介して蛍光基を導入した 4 糖オキサゾリン誘導体（**1**）を合成した。一方、糖受容体基質として FRET ペアーとなる蛍光基をアミノプロピルリンカーを介して導入した GlcNAc 誘導体（**2**）を合成した。得られた供与体（**1**）の受容体（**2**）に対する Endo-M-N175Q を用いた糖転移反応を HPLC にて追跡し、新たに糖転移生成物（**3**）のピークが生じることを確認した。同様に、反応液の蛍光変化を追跡したところ、糖転移生成物の増加に伴い蛍光が変化することを確認した。本アッセイ系は ENGase の糖転移活性を高感度かつリアルタイムで検出できるため、糖転移活性の高い改変型 ENGase の効率的なスクリーニングが可能になると期待している。




[1] P. M. Danby *et al.*, *ACS Chem. Biol.*, **2016**, *11*, 1784-1794.
[2] a) M. Umekawa *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta.* **2010**, *1800*, 1203-1209.
b) S. Murakami *et al.*, *Glycobiology*, **2013**, *23*, 736-744.

Endo-*β*-*N*-acetylglucosaminidase(ENGase), transglycosylation, synthesis

発表責任者：石井希実（t15805002@gunma-u.ac.jp）

講演番号：3J29a08
講演日時：3 月 19 日 11:15～ J 校舎 29 会場

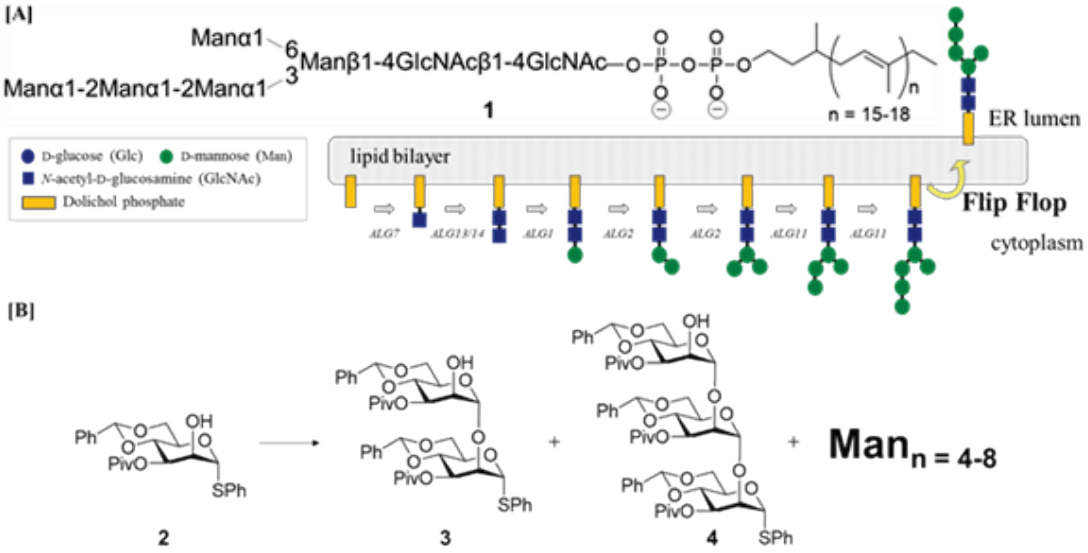
# 連続的グリコシル化反応によるオリゴマンノシドの合成

# Chain-growth polymannosylation for synthesis of α-1,2 linked mannooligosaccharides

○佐野 加苗、吉村 弥生、松尾 一郎（群馬大院理工）
○Kanae Sano, Yayoi Yoshimura, Ichiro Matsuo (Gunma Univ.)

糖鎖はタンパク質の表面などに存在し、細胞間で起こる様々な情報伝達を担っている。そのため、生体内における糖鎖の挙動を詳細に解析することは、疾患の原因や生命現象を明らかにする上で重要である。我々は、化学的手法により均一構造の糖鎖を合成することで、糖鎖の構造と機能の関係を明らかにすることを目指している。特に、アスパラギン (*N*-)結合型糖鎖の生合成過程における糖鎖の Flip Flop 現象に着目し、生合成中間体 7 糖 **1** の系統的合成を進めている (Fig. A)。

生合成中間体 7 糖 **1** の構築にあたり、オリゴマンノシドを効率的に合成することが鍵となる。そこで我々は、マンノース残基の 2 位に遊離の水酸基を有するチオマンノシド誘導体 **2** を用いた連続的なグリコシル化反応により，必要なオリゴマンノシドを合成することとした。化合物 **2** がグリコシルドナー/アクセプターとして連続的に反応することで、保護・脱保護の煩雑な工程を重ねることなく一工程で簡便にオリゴマーを得ることが期待できる。実際に、化合物 **2** に対して NIS/TfOH 条件下で反応を行った結果、マンノビオース誘導体 **3** およびマンノトリオース誘導体 **4** が得られた。また、活性化条件によって、オリゴマンノシドの生成比を制御できることが明らかとなった (Fig. B)。今後、化合物 **4** を効率的に得るための条件の検討、得られた **4** を用いた高マンノース型糖鎖の構築を進める予定である。




[A] アスパラギン(*N*-)結合型糖鎖の生合成過程　[B] チオマンノシド誘導体 **2** を用いたマンノオリゴシドの合成

glycosylation, polymerization, Flip Flop

講演番号：3J29a09
講演日時：3 月 19 日 11:30～ J 校舎 29 会場

# ヒト UGGT の触媒活性に与えるドメインの解析

# Analysis of Domain Function Affecting Catalytic Activity of Human UGGT

○武田 陽一[1,2]、今村 有希[1]、瀬古 玲[2]、藤川 紘樹[2]、和泉 雅之[3]、梶原 康宏[3]、伊藤 幸成[2,4]([1]立命館大生命科学、[2]JST ERATO、[3]阪大院理、[4]理研)
○Yoichi TAKEDA[1,2], Yuki IMAMURA[1], Akira SEKO[2], Kohki FUJIKAWA[2], Masayuki IZUMI[3], Yasuhiro KAJIHARA[3], Yukishige ITO[2,4] ([1]Ritsumeikan Univ., [2]JST ERATO, [3]Osaka Univ., [4]RIKEN)

「目的」

UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase (UGGT) 1 は小胞体に存在する可溶性のタンパク質であり、ミスフォールド糖タンパク質上にある高マンノース型糖鎖に対して特異的にグルコースを転移する特徴を有している[1]。一方で、ヒト UGGT1(HUGT1)のアイソフォームである HUGT2 には糖転移活性はないと考えられていた。しかしながら我々は最近、蛍光分子をアグリコン部分に導入した高マンノース型糖鎖[2]を用いて、HUGT2 の酵素活性を再検討したところ明確なグルコース転移活性を見出している[3]。これまでに我々は HUGT1 および HUGT2 の様々なトランケートタンパク質を用いて、C 末端側に存在し全体の 20%程度を占める両者の触媒ドメインの糖転移活性に差はないことを明らかにしてきた。また、このドメインのみでも糖タンパク質のフォールディング/ミスフォールド状態を見分けていることを、化学合成した高マンノース型糖鎖を有する糖タンパク質［IL8(M9)］を基質とした実験で明らかにしている。今回我々は、HUGT1 と HUGT2 のドメインを入れ替えた様々なキメラタンパク質を調製し、アグリコン部分に蛍光分子を有する高マンノース型糖鎖 (M9-Gly-BODIPY)に対する糖転移を比較することで糖転移活性に大きな影響を与えるドメインを探った。

「方法及び結果」

HUGT1 および HUGT2 を 6 つのドメインに分割し、HUGT1、HUGT2 のドメインから構成されるキメラタンパク質を調製した。C 末端側触媒ドメインを入れ替えても糖転移活性は維持するものの、その性状は N 末端側を構成するアミノ酸配列に依存すること、また、触媒ドメインとその N 末端側に隣接するドメインを同時に入れ替えた場合にはその性状は C 末端側を構成するアミノ酸配列に依存することを明らかにした。さらに HUGT1 の触媒ドメインに隣接するドメインのみを HUGT2 のアミノ酸配列に入れ替えた場合には大きく活性を低下させるのに対し、HUGT2 の触媒ドメインに隣接するドメインのみを HUGT1 のアミノ酸配列に入れ替えた場合には大きな影響を受けないことから、HUGT1 と HUGT2 の糖転移活性の大きな違いは触媒ドメインに隣接するドメインの構造に依存していることが示唆された。

[1] Parodi et al., Annu. Rev. Biochem., 2000, 69, 69.
[2] Totani et al., Biochemistry, 2009, 48, 2933.
[3] Takeda et al., Glycobiology, 2014, 24, 344.

UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase, high mannose-type glycan, glycoprotein quality control

発表責任者：武田陽一（yotakeda@fc.ritsumei.ac.jp）

講演番号：3J29a10
講演日時：3 月 19 日 11:45～ J 校舎 29 会場

# Upregulation of Sialylated N-glycan Expression in Human Hepatoblastoma Cell Line Expressing Hepatitis B Virus

○Surya Agung Priyambada[1], Ryo Misaki[1], Toru Okamoto[2], Yuta Okamoto[1], Takao Ohashi[1], Yoshiharu Matsuura[2], Kazuhito Fujiyama[1] ([1]Laboratory of Applied Microbiology, International Center for Biotechnology, Osaka University, [2]Departement of Molecular Virology, Research Institute for Microbial Disease, Osaka University)

**Introduction**

Hepatitis B virus (HBV) is the smallest partially double-stranded (ds) DNA virus known to infect human. Chronic HBV (CHB) infection leads to the progression of hepatocellular carcinoma (HCC). More than 50% of HCC cases in the world are related to the CHB. Development of HCC from normal hepatocellular is characterized by changes of N-glycosylation. Alteration of cell surface glycosylation can promote invasive behavior of tumor cell that ultimately leads to the progression of cancer. However, few is understood about the cell surface N-glycans of HBV-infected liver cells. We try to address the problem by taking advantages of HepAD38 cell line to emulate the CHB hepatocyte condition. In addition, our method offers alternatives to N-glycan analysis by liver biopsy. In the presence of antibiotic, this cell line is free from virus due to the repression of pregenomic (pg) RNA synthesis. Upon removal of antibiotic from the culture medium, the cells express viral pgRNA and start to secrete virions into the supernatant.

**Results**

We analyzed the expression of glycosyltransferases and compared the cell surface N-glycan composition of the induced and suppressed HepAD38 cells. Among the upregulated glycosyltransferases by the expression of HBV were GnT-II, GnT-IVa, ST6Gal1, and GnT-V; while GnT-I, GnT-III, β4GalT1, and FUT8 were downregulated. About one-third of the cell surface N-glycans found on induced HepAD38 were sialylated. As of suppressed HepAD38, it was 7% lower compared to the induced cells. Both treatments did not prompt the difference of expression in both complex type and fucosylated cell surface N-glycan, about 50% and 60%, respectively.

**Discussion**

Our results showed that the expression of HBV triggers higher sialylation in HepAD38 cells. Altogether, HBV expression triggered the alteration to cell surface N-glycosylation pattern and the expression level of glycosyltransferases of HepAD38 cells.

Sialylation, N-glycosylation, HBV

講演番号：3J29p03
講演日時：3 月 19 日 14:30～ J 校舎 29 会場

# 超好熱アーキア *Pyrobaculum aerophilum* 由来 galactose-1-phosphate uridylyltransferase の構造解析

# Structural analysis of galactose-1-phosphate uridylyl transferase from hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum aerophilum*

○花川 大地[1]、林 順司[1]、米田 一成[2]、大島 敏久[3]、櫻庭 春彦[1] ([1]香川大農、[2]東海大農、[3]大工大工)
○Daichi HANAKAWA[1], Junji HAYASHI[1], Kazunari YONEDA[2], Toshihisa OHSHIMA[3], Haruhiko SAKURABA[1] ([1]Kagawa Univ., [2]Tokai Univ., [3]Osaka Inst.Tech.)

**【背景】**一般に Galactose はルロワール経路を経て Glucose-1-phosphate (Glc-1-P)へ変換され、解糖系へと送られる。ルロワール経路は①Galactokinase による Galactose-1-phospahte (Gal-1-P)の生成、②UDP-Glucose (UDP-Glc)と Gal-1-P から、Galactose-1-phosphate uridylyltransferase (GALT)による UDP-Galactose (UDP-Gal)と Glc-1-P の生成、③UDP-Galactose-4'-epimerase (GalE)による UDP-Gal の UDP-Glc への変換の 3 ステップで進行する。この代謝経路は、バクテリアや真核生物では比較的研究がなされているが、アーキアではほとんど研究が進んでいない。我々はゲノム情報から、超好熱アーキア *Pyrobaculum aerophilum* に GALT ホモログをコードする遺伝子(ORF ; PAE1184)を見出した。本研究では本遺伝子の大腸菌での発現系の構築、機能解析と構造解析を行った。

**【方法】**PAE1184 を PCR 法にて増幅後、pET-11a ベクターに組み込み、大腸菌 BL21 Codon Plus (DE3)RIL を形質転換させた結果、耐熱性 GALT の生産が確認できた。本酵素の精製は 80℃、10 min の熱処理、陰イオン交換クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィーで行った。結晶化はシッティングドロップ蒸気拡散法により行い、得られた結晶を用いて X 線回折実験を行なった

**【結果】**本酵素のゲル濾過クロマトグラフィーから求めた分子量は 59 kDa であった。SDS-PAGE から求めたサブユニットの分子量は 36 kDa であることから、本酵素はホモ 2 量体構造をとることが予測された。X 線回折実験の結果、空間群 $P4_1$、分解能 2.33 Å の回折データが得られた。構造決定は、大腸菌由来 GALT の構造をモデルにした分子置換法によって行った。構造解析の結果、本酵素は結晶中でもホモ 2 量体を形成することが明らかとなった。本酵素と大腸菌由来 GALT を比較した結果、N 末端の構造に大きな違いが見られた。大腸菌由来 GALT は A サブユニットの N 末端が、B サブユニットまで伸張し、B サブユニットの基質結合部位の一部を形成していた。これに対して本酵素では、サブユニットの N 末端が全く異なる方向に伸張しており、同一サブユニット内に収まっていた。大腸菌由来 GALT では隣のサブユニットに伸張した N 末端の ARG28 と ARG31 が基質と相互作用することが明らかになっている。本酵素の N 末端にも相当するアミノ酸残基である ARG19 と ARG22 が保存されているが、大腸菌由来 GALT とは大きく離れた位置に存在していた。本酵素が基質と結合した場合、この N 末端と 2 つのアミノ酸がどのような構造変化を示すのか興味深い。触媒残基の 1 つと予想される H140 に変異を加えた不活性型酵素を作製し、基質結合状態での構造解析をめざして、精製、結晶化を検討している。

Galactose-1-phosphate uridylyltransferase, Hyperthermophile, Archaea

講演番号:3J29p04
講演日時:3 月 19 日 14:45～ J 校舎 29 会場

*Bacillus subtilis* 168 由来中性亜鉛プロテイナーゼの 1.1Å分解能立体構造
Crystal structure of neutral metalloproteinase from *Bacillus subtilis* 168 at 1.1 Å resolution.
植村 誉[1]、伊藤 貴文[1]、吉水 正則[2]、吉浦 由里子[2]、宮嶋 俊吉[2]、○日ビ 隆雄[1] ([1]福井県大・生物資、[2]HBI(株))
Homare Uemura[1], Takafumi Itoh[1], Masanori Yoshimizu[2], Yuriko Yosiura[2], Shunkichi Miyajima[2], ○Takao Hibi[1] ([1]Fukui Prefectural Univ., [2]HBI Enz. Inc.)

［目的］
中性亜鉛プロテイナーゼ(Npr)は、亜鉛を活性中心に配したバクテリア由来の分泌型タンパク質分解酵素である。高齢者では、咀嚼能力の低下とそれに伴う栄養不足が問題となっており、タンパク質源である食肉の柔軟加工は高齢化社会への対応策の一つとなる。食肉の酵素処理では、風味を損なわないために低温処理が前提になるが、その場合、酵素反応が低下し処理速度が不十分となる。そこで低温下でも十分な高活性を有する酵素を調製することが求められる。
一般に、低温で高活性を示す好冷酵素は柔軟な構造を持つことが示唆されてきた。既に、Npr ファミリーの代表的酵素であるカルボキシペプチダーゼやサーモリシンなどで活性中心の構造や機能について詳細な解析が行われてきたが、亜鉛錯体は可視紫外吸収を示さないことなどから、動的な構造の詳細については未だ不明な点が多い。本研究では、食肉柔軟加工用として低温下で高活性な変異体を取得する上で重要な構造的特徴を明らかにするため、*Bacillus subtilis* 168 由来中性亜鉛プロテイナーゼ $NprE^{168}$ について精密 X 線結晶構造解析を行った。
［方法と結果］
*B. subtilis* 168 株由来 NprE 遺伝子をベクターpC194 に組込み、*B. subtilis* 168 培養上清中に本酵素を分泌生産した。硫安分画とアセトン分画を行い、さらに陽イオン交換クロマトグラフィーにより、SDS-PAGE 上単一バンドとなるまで精製した。結晶化条件をスクリーニンした結果、野生型酵素では結晶が得られなかったが、野性型に比べ 1/10 に活性が低下した変異体 Y158D について良質の結晶が得られた。SPring-8 のビームライン BL-38B1 及びあいちシンクロトロン放射光施設のビームライン BL2S1 においてX線回折測定を行い、1.1Å及び 1.15Å 分解能の回折強度データを収集した。Npr ファミリーである *S. aureus* 由来プロテアーゼ aureolysin の立体構造をモデルとし初期位相を決定し、精密化により *R* 値 11.2 及び 11.3%で結晶構造を決定した。
1.15Å 分解能の結晶構造では、非対称単位中に存在する 2 分子のうち、活性中心 $Zn^{2+}$の片方のみに $SO_4^{2-}$が配位していた。さらに、$SO_4^{2-}$の結合に伴い、$Zn^{2+}$に配位する E167 が 2 つのコンフォメーションを取ることが判明した。表面ループの変異による活性の低下は、基質結合に伴って生じる活性中心 $Zn^{2+}$周囲の配位構造の揺らぎへの影響により生じたこと、従って低温下での高活性化には、柔軟性の付与に加えて配位構造の制御が必要となることが示唆された。

Metalloproteinase, zinc complex, meat tenderizer

発表責任者:日び隆雄(hibi@fpu.ac.jp)

講演番号：3J29p05
講演日時：3 月 19 日 15:00～ J 校舎 29 会場

# Cleaved 型ニューロセルピンの結晶構造から明らかとなったプロトマー連結領域の不安定化

# The crystal structure of cleaved neuroserpin reveals instability of the linkage region of the protomer

○久留宮 綾人[1]、津田 美代子[1]、山崎 正幸[2]、恩田 真紀[1]（[1]阪府大理、[2]龍谷大農）
○Ayato Kurumiya[1], Miyoko Tsuda[1], Masayuki Yamasaki[2], Maki Onda[1]（[1]Osaka Pre. Univ., [2]Ryukoku Univ.）

【目的】ニューロセルピンは脳中枢神経系に局在するタンパク質で、tPA（tissue-type plasminogen activator）を阻害することで、記憶や感情の制御に関与している。ニューロセルピンの S49P 変異体はポリマー化しやすく、これが脳内で凝集し蓄積すると、認知症を引き起こす。S49P 変異はプロトマーの連結領域に存在することから、この変異近傍の構造を決定する事は、ポリマーの伸長機構を明らかにする上で重要である。そこで、プロトマーの連結領域と酷似した構造を持ち、かつポリマーよりも安定で結晶化の実績が多い Cleaved 型（ニューロセルピンが標的プロテアーゼを阻害する際に生じる熱安定な分子種）に着目し、これの X 線結晶構造解析を行うことで、変異が分子構造に与える影響を明らかにすることを試みた。
【方法と結果】S49P はミスフォールディングしやすく、様々なホストで発現を試みたが可溶性画分から得られなかった。そこで、Long-time refolding 法という新奇の精製法を開発することにより、Native 型 S49P の大量調製に成功した。得られた同タンパク質を標的プロテアーゼである tPA で限定加水分解し、Cleaved 型 S49P を調製した。その後、結晶化を行い、得られた良質な結晶を用いて、大型放射光施設 SPring-8 にて X 線回折測定を行った。その結果、分解能 1.9Åのデータを得ることに成功し、Cleaved 型 S49P の構造を決定した。得られた構造と、野生型の Cleaved 型の構造（PDB code : 3F02）を比較したところ、His338 と分子内部のコアとの相互作用が、野生型に比べて弱くなっていることが示唆された。Ser49 と His338 はセルピンにおいて非常に保存性が高く、セルピン分子の安定性やポリマー化に関与する the shutter region H-bond network を形成する重要な残基である。S49P 変異体では、このネットワークが壊れていることが今回得た構造から明らかとなった。これらの事から、S49P の β-シート A は野生型のそれに比べて剥がれ易く、Cleaved 型 S49P はより不安定であると予想された。
　そこで、円偏光二色性測定により、S49P と野生型の、Cleaved 型とポリマーについて、$T_m$ 値及び変性剤に対する安定性を調べ、熱力学的解析を行った。その結果、S49P の Cleaved 型とポリマーいずれも、野生型のそれより不安定であることがわかった。また、変性の自由エネルギー変化から、Ser49 が Pro に変わることにより、13.36 kcal/mol のエネルギー差が生じることがわかった。これらの結果は、結晶構造から得られた知見とよく一致し、S49P のポリマーが野生型のそれに比べ不安定であることや、S49P の Latent 型（自己ループ挿入による安定型）がポリマー化するというこれまでの報告に合致する。

crystal structure, protomer, polymer

発表責任者：久留宮綾人（kurumiya13@b.s.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：3J29p06
講演日時：3 月 19 日 15:25～ J 校舎 29 会場

# ウミシイタケ由来ルシフェラーゼの安定化

# Stabilization of luciferase from *Renilla reniformis*

○石橋 松二郎[1]、Laksmi Fina[1]、新井 栄揮[2]、徳永 正雄[1] ([1]鹿大農、[2]量研機構)
○Matsujiro Ishibashi[1], Fina Laksmi[1], Shigeki Arai[2], Masao Tokunaga[1] ([1]Kagoshima Univ., [2]QST)

【目的】

化学発光タンパク質である *Renilla reniformis*（ウミシイタケ）由来 Luciferase (RLuc)は、分子量約 36kDa の単量体タンパク質で、*in vitro* では、基質 coelenterazine(セレンテラジン)と酸素存在下で反応し、その際に青色の発光(480nm)を生じる。そのためルシフェラーゼは主にレポータータンパク質やバイオイメージングとして広く用いられている。蛍光タンパク質である *Aequorea victoria*(オワンクラゲ)由来 Green Fluorescent Protein (GFP)と比較すると定量性で優れているというメリットがある。

しかし、この RLuc は 37℃条件下で大腸菌内発現を行うと不溶性に発現し、さらに様々なストレス下に対しても不安定である。そこで本課題では、RLuc 遺伝子に変異を導入する事により、熱に安定な RLuc 変異体の獲得を目指した。変異体の獲得にはエラープロン PCR を用いたランダム変異法や部位指定変異法を行った。

【結果】

我々は熱安定性や活性が上昇した４つの変異体 F116LI137V, N264SS287P, N178D, I75A を取得出来た。さらにこの変異体を組み合わせることにより熱安定性と活性をさらに上昇させることに成功した。耐熱性試験の結果、野生型 Rluc は 45℃でほぼ失活するのに対し、変異体は 100%活性を保持し、55℃で完全に失活した。すなわち野生型と比べて熱安定性が約 10℃上昇した。また比活性も約 1.2 倍上昇した。

さらにこの変異体は同時に、トリプシンやプロテナーゼ K のプロテアーゼ消化に対する耐性や有機溶媒存在下での安定性を増加させた。10% 2-プロパノール、10% ジメチルホルムアミド、20% ジメチルスルホキシド存在下で、35℃、1 時間処理後の残存活性は、野生型がそれぞれ 0.4%、0.1%、24.3%に対して変異体はそれぞれ 29.4%、24.8%、91.3%であった。

luciferase, mutation, stabilization

講演番号：3J29p07
講演日時：3 月 19 日 15:40～ J 校舎 29 会場

# マウス由来フェロモン受容体 V2R 細胞外領域の昆虫培養細胞による組換え発現

# Recombinant expression of mouse pheromone receptor V2R extracellular domains in insect cells

○岩谷 達、安井 典久、山下 敦子（岡山大院・医歯薬）
○Susumu Iwatani, Norihisa Yasui, Atsuko Yamashita (Grad. Sch.,Okayama Univ.)

＜背景・目的＞

脊椎動物の中には、種または性特異的な化学物質であるフェロモンを用いて、仲間への危険の伝達や異性の誘引などのコミュニケーションを行っている種がある。これらのフェロモンのうち、7~18 kD ほどの小さなタンパク質である ESP(exocrine gland secreting protein)は、鋤鼻器の細胞において発現している vomeronasal receptor type2(V2R)によって受容されることが分かっている。V2R は GPCR のクラス C ファミリーに属しており、大きな細胞外領域を持つという構造的特徴を有している。この細胞外領域は、ligand binding domain (LBD)及び cysteine rich domain (CRD)からなり、この領域において多様なフェロモンが受容される。しかし、フェロモン認識やそれに伴うシグナル伝達のメカニズムは分かっていない。その理由の一つとして、未だに V2R の構造解析がなされておらず、受容体とフェロモンとの相互作用の詳細や、フェロモン結合によって起こる受容体の活性化機構などが不明であることが挙げられる。そこで、フェロモンと V2R 間の相互作用の詳細を解明するため、構造解析に向けた V2R 細胞外領域の発現系の確立を目的とし、昆虫培養細胞を用いた組換え発現を行った。

＜方法・結果＞

6 種のマウス由来の V2R について、同じクラス C ファミリーに属し、結晶構造が明らかになっている代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)1 とのアミノ酸配列アライメントを行い、LBD 及び CRD の領域を決定した。V2R 細胞外領域の LBD までの断片(LBD)と CRD までを含む断片(ECD)の C 末端に精製タグである FLAG tag(DYKDDDDK)を融合した発現ベクターを構築した。分泌効率が高く、受容体細胞外領域の発現系としてよく用いられるショウジョウバエ S2 細胞に、この発現ベクターを導入し、V2R 細胞外領域を一過性発現させた。その結果、6 種の V2R のうちのほとんどが細胞内にとどまり、細胞外への顕著な分泌発現は見られなかった。また、僅かに発現した V2R1 と V2R6 においては、LBD と ECD を比較すると、LBD の方が僅かに高い分泌量を示した。一方、先行研究において、V2R の膜移行を促進すると報告されている MHC クラス 1b 及びβ2 ミクログロブリン分子との共発現も試みたが、V2R の発現に顕著な変化は見られなかった。6 種の中で最も高い分泌発現が見られた V2R1 の LBD については S2 細胞を用いて、安定発現株の作製を行った。今後、この安定発現株を用いて発現した V2R1LBD の性状解析を行っていく予定である。

Pheromone, V2R, Recombinant expression

発表責任者：岩谷　達（pdq05j29@s.okayama-u.ac.jp）

講演番号：3J29p08
講演日時：3 月 19 日 15:55～ J 校舎 29 会場

# イネ由来ディフェンシンのヒト病原菌に対する抗菌効果とその特性

# Antimicrobial effect of rice defensin against human pathogens and its properties

○落合 秋人[1]、金岡 巧[1]、提箸 祥幸[2]、田中 孝明[1]、谷口 正之[1]([1]新潟大・自然研、[2]農研機構・北農研)
○ Akihito OCHIAI[1], Takumi KANAOKA[1], Yoshiyuki SAGEHASHI[2], Takaaki TANAKA[1], Masayuki TANIGUCHI[1] ([1]Grad. Sch. of Sci. Technol., Niigata Univ., [2]NARO Hokkaido Agr. Res. Cent.)

【目的】各種生物由来のディフェンシンは，生体防御において重要な役割を有する低分子タンパク質である。このタンパク質は分子内に複数のジスルフィド架橋を含むことから，分解酵素や熱に対する高い耐性を有することがよく知られている。我々は，長い食経験を持つイネ(*Oryza sativa*)由来ディフェンシン OsAFP1 に着目して，その抗菌活性などの機能に関して研究を進めている。本研究では，それらの一つである OsAFP1 のヒト病原菌に対する抗菌スペクトルを明らかにし，その熱安定性などの特性評価を行った。一方で，OsAFP1 に関しては，既にその部分配列を有する断片ペプチドについての研究が行われており，2 つの断片ペプチド(Peptide-1, -7)が OsAFP1 タンパク質と同様に抗真菌活性を示すことが報告されている。そこで，これらの知見を踏まえて，フローサイトメトリー(FCM)による細胞膜損傷作用およびその立体構造を解析して，OsAFP1 の抗真菌活性に関わる構造要因を推察した。
【方法と結果】濁度法により大腸菌やニキビ菌など合計 8 種の真菌もしくは細菌に対して抗菌(抗真菌)活性を測定した結果，ヒト口腔内真菌 *Candida albicans* に対して特異的な活性を示し，その最小発育阻害濃度(MIC)は約 5μM であった。また，OsAFP1 は，100℃,10 分間の加熱処理，または 24 時間の血清処理に対して活性を失うことはなく，高い耐熱性および耐血清安定性を有することを明らかにした。

OsAFP1 および Peptide-1, -7 の細胞膜損傷試験を行った結果，OsAFP1 と peptide-7 は共に *C. albicans* の細胞膜損傷を引き起こさず，これらは類似した作用機構を有する可能性を示した。一方で，peptide-1 は弱い細胞膜損傷作用を示した。一般に，タンパク質由来の断片ペプチドはそのペプチドの性質を反映した新しい性質を示すことが多いが，OsAFP1 は低分子(アミノ酸 49 残基)であるため，peptide-7(アミノ酸 10 残基)は OsAFP1 の抗真菌活性に対する性質を残した可能性がある。そこでホモロジーモデリングにより作製した OsAFP1 の立体構造を解析した。その結果，peptide-7 はこの領域のみで 2 次構造(β-hairpin 構造)を形成することがわかった。また，peptide-1 も隣接する領域に位置することから，これらの部位が抗真菌活性に直接的に関与する可能性が示唆された。一方で，これらのペプチド処理に対して，*C. albicans* は OsAFP1 処理時とは異なる形態変化を示すことが過去に報告されている。OsAFP1 の抗真菌活性に関わる構造要因の同定には，さらなる検証実験が必要といえる。

defensin, *Candida albicans*, antimicrobial protein

発表責任者：落合秋人（ottie@eng.niigata-u.ac.jp）

講演番号：3J29p09
講演日時：3 月 19 日 16:10～ J 校舎 29 会場

# 卵黄由来の生理活性ペプチド経口投与の骨形成に対する影響

# Effects of a bioactive peptide derived from egg yolk on bone formation by oral administration

○豊浦 雅義[1]、中村 唱乃[1]、北浦 義昭[2]、大庭 伸介[2]、鄭 雄一[2]([1]（株）ファーマフーズ、[2]東京大学大学院 工学研究科)
○Masayoshi TOYOURA[1], Utano NAKAMURA[1], Yoshiaki KITAURA[2], Shinsuke OHBA[2], Ung-il CHUNG[2] ([1]Pharma Foods International Co., LTD., [2]Tokyo University Graduate School of Engineering)

【背景・目的】
鶏卵黄の酵素分解物より、骨芽細胞増殖活性および軟骨細胞増殖活性を指標に、生理活性ペプチドを単離同定した。本研究では、骨関連疾患に対する医療応用を目指して、同定されたペプチドを合成し、経口投与した際の成長期ラットおよび骨折マウスモデルの骨形成に対する影響を検討した。
【方法】
① 成長期ラットを用いた骨形成促進作用の検討
雄性 W1 ラット 4 週齢（N=10）に、注射用水または当該ペプチド(1、10、100 mg/kg BW)を 1 日 1 回、計 7 回経口投与した。試験 8 日目に下肢を摘出し、骨形態計測を行った。
② 骨折マウスモデルを用いた骨折治癒促進作用の検討
雄性 C57BL/6 マウス 8 週齢の左後肢脛骨中央部を横骨折させ、骨折モデルを作成した。作成した骨折モデルマウス（N=4）に、術後 1 日目から注射用水または当該ペプチド(10 mg/kg BW)を 1 日 1 回、計 14 回経口投与した。術後 4、7、11、14 日目に IVIS imaging system により骨形成 in vivo imaging を評価し、術後 14 日目に左側脛骨を摘出してμCT により骨形成を評価した。
【結果・考察】
① 成長期ラットを用いた骨形成促進作用の検討
脛骨部位において、当該ペプチドは、成長軟骨の長軸方向への伸長を濃度依存的に促進した。また二次海綿骨においても、当該ペプチドは、骨石灰化を濃度依存的に促進した。
② 骨折モデルマウスを用いた骨折治癒促進作用の検討
脛骨骨折部位において、in vivo imaging で評価した結果、当該ペプチドは、仮骨形成を示すシグナル強度を有意に増強した。また、μCT 解析においても、当該ペプチドは、骨折部位の仮骨量を有意に増大させた。
上記の結果より、卵黄由来の生理活性ペプチドは、経口投与で骨形成促進作用並びに骨折治癒促進作用を示し、骨関連疾患に対する医療応用の可能性が示唆された。

Peptide engineering, Bone formation

発表責任者：豊浦雅義（toyoura@pharmafoods.co.jp）

講演番号：3J29p10
講演日時：3 月 19 日 16:25～ J 校舎 29 会場

# コメ糠タンパク質酵素加水分解物からのカチオン性ペプチドの精製と同定およびそれらの生理活性の解明

# Purification and identification of cationic peptides from enzymatic hydrolysate of rice bran protein and elucidation of their bioactivities

○谷口 正之、亀田 光裕、野本 貴史、生江 俊樹、齊藤 健吾、落合 秋人、田中 孝明（新潟大自然研）
○Masayuki Taniguchi, Mitsuhiro Kameda, Takafumi Nomoto, Toshiki Namae, Kengo Saito, Akihito Ochiai, Takaaki Tanaka (Niigata Univ.)

**【目的】**当研究室では，これまでに３種類のコメタンパク質の部分配列から抗菌ペプチドを見出しており，それらのペプチドは，分子量が 1, 000～3, 000 Da 程度であること，正味の正電荷を持つこと，等電点が８以上のカチオン性であることなどの共通の特性を有していることを報告している[1, 2]。また，抗菌ペプチドは，抗炎症や創傷治癒などの生理活性を兼ね備えていることを報告している[3]。そこで本研究では，コメ糠タンパク質のペプシン加水分解液を等電点電気泳動によって分離し，カチオン性ペプチドを調製した。得られた画分の生理活性を明らかにするために，ヒト病原微生物に対する抗菌活性を測定した。また，抗菌活性を有する画分に含まれるペプチドを精製し，質量分析計を用いて同定した。さらに，同定したペプチドを化学合成し，それらの抗菌活性，内毒素中和活性，および血管新生活性について検討した。

**【実験方法】**本研究では，ペプシンを用いてコメ糠タンパク質を加水分解し，ペプチドサンプルを調製した。得られたペプチドサンプルを，調製用等電点電気泳動装置（BioRad, Rotofor）を用いて 20 の画分に分画した。各画分の歯周病菌，アクネ菌，日和見感染真菌などに対する抗菌活性を測定した。次に，逆相クロマトグラフィーを用いて活性を検出できた画分からペプチドを精製し，飛行時間型質量分析計（MALDI TOF-MS）を用いて各画分に含まれるペプチドを同定した。同定したペプチドを化学合成し，それらの抗菌活性を，既に報告している方法[1, 2]を用いて測定した。また，同定したペプチドの内毒素中和活性[3]および血管新生活性を測定した。

**【結果】**ペプシンを用いてコメ糠タンパク質を加水分解した後，等電点電気泳動によって 20 画分に分画した。反応条件によって各画分の pH と収量が異なっており，各画分の抗菌活性も異なっていた。これまでの結果から，ペプシンを用いて米糠タンパク質を５時間加水分解したサンプル中のカチオン性ペプチド画分が最も高い抗菌活性を示し，歯周病菌，アクネ菌，日和見感染真菌などに対して抗菌活性を発揮することを確認した。現在までに，等電点が高い 3 つの画分から，等電点が９以上の５種類のペプチドを同定した。現在，カチオン性ペプチドの同定をさらに進めるとともに，同定できたペプチドの抗菌活性を測定中である。また，カチオン性ペプチドの内毒素中和活性および血管新生活性についても検討する予定である。

1) M.Taniguchi *et al.*, ***Peptides,*** Vol.48, p.147-155 (2013). 2) M.Taniguchi *et al.*, ***Peptide Science,*** Vol.104, p.73-83 (2015). 3) M. Taniguchi *et al.*, ***Peptides,*** Vol.75, p.101-108 (2016).

rice bran protein, cationic peptide, bioactive peptide

発表責任者：谷口正之（mtanig@eng.niigata-u.ac.jp）

講演番号：3J29p11
講演日時：3 月 19 日 16:50～ J 校舎 29 会場

機能未知タンパク質の新たなアノテーション手法
Novel approach for functional annotation of hypothetical protein
○渡辺 誠也（愛媛大院・農）
○Seiya WATANABE (Ehime Univ.)

【背景・目的】ゲノム解読技術の進歩にともなう機能未知遺伝子（タンパク質）は膨大な数にのぼる。タンパク質（酵素）進化のリクルート仮説によれば、始原細胞の持っていた酵素の種類は現在より少なくその基質特異性もずっとゆるやかで、遺伝子が重複するに従い特定の化合物のみ反応するように進化した。このシナリオに従うならば、構造的に類似した化合物に作用する酵素の一次構造上の相同性があることは自然であり、事実、同一のタンパク質ファミリーに属する酵素の基質はよく似ている。現行の機能未知タンパク質のアノテーションは、この過程を逆にたどることで反応や基質を特定しようとしているわけだが、このためには少なくとも機能既知タンパク質の報告例が 1 つは必要である。ただ、これでもせいぜい反応の種類と基質の基本骨格のイメージができる程度で、全く新しい触媒反応の発見もほぼ不可能である。これに対し、ゲノム構造がコンパクトな微生物では代謝系の遺伝子（酵素）群がクラスター化している場合が多く、構成される遺伝子の機能には相関がありそこから酵素の基質をイメージできると考え、その有用性を検証した。
【結果】アコニターゼファミリーには、4 つのサブファミリーが存在しており、このうちアコニターゼ・ホモアコニターゼ・イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼの 3 つについては、類似した構造を持つ基質のヒドロキシル基と特定の水素原子を取り出し立体化学的に異性化する反応を触媒する。これに対しアコニターゼ X（サブファミリー）には既知の活性が見られない。つまり、アミノ酸配列の相同性（“見かけ”）に基づく機能推定は絶望的である。一方、遺伝子の位置関係（“周り”）に注目すると L-ヒドロキシプロリン代謝遺伝子が集まったクラスター内に存在することに気がついた。そこで、多数の L-ヒドロキシプロリンの異性体化合物を基質候補として与えてみたところ、シス-3-ヒドロキシ-L-プロリン（C3LHyp）のみが速やかに消費され、さらにその後の反応生成物の分析から C3LHyp 脱水酵素として機能することが分かった。アコニターゼ X 遺伝子を有する細菌は C3LHyp を資化でき、その遺伝子も C3LHyp で誘導された。
【考察】C3LHyp 脱水酵素の基質と触媒する化学反応は、既知のアコニターゼファミリーの酵素とは全く似ていない。アミノ酸配列との相同性を重視する従来の研究手法では、アコニターゼ X の基質として C3LHyp を選択する必然性は皆無であり、本法は機能未知タンパク質のアノテーションに新たな一石を投じると考えられる。
【参考文献】Watanabe *et al.*, *Scientific Reports* 6:38720 (2016)

Protein annotation, Aconitase, Hydroxyproline

発表責任者：渡辺誠也（irab@agr.ehime-u.ac.jp）

講演番号：3J29p12
講演日時：3 月 19 日 17:05～ J 校舎 29 会場

# 分子シャペロン calnexin と相互作用する PDI ファミリータンパク質の探索

# Exploration of PDI family protein interacted with molecular chaperone calnexin.

○中尾 仁美[1]、瀬古 玲[2]、伊藤 幸成[3]、迫野 昌文[1]([1]富大院理工、[2]JST,ERATO、[3]理研)
○Hitomi NAKAO[1], Akira SEKO[2], Yukishige ITO[3], Masafumi SAKONO[1] ([1]Grad. Univ. Toyama, [2]JST,ERATO, [3]RIKEN)

【目的】小胞体内在シャペロンである calnexin (CNX)および calreticulin は、糖タンパク質の品質管理において重要な役割を果たすことが知られている。これらのシャペロンは protein disulfide isomerase ファミリータンパク質(PDIs)の一つである ERp57 と複合体を形成し、協同的に糖タンパク質のフォールディング補助を行うと考えられている。近年、ERp57 以外のいくつかのタンパク質において相互作用が確認されており[1],[2]、シャペロンが複数のタンパク質と複合体を形成していることが示唆された。本研究では、CNX と相互作用する PDIs の探索を目的とし、プルダウン法を用いて CNX と複合体を形成する PDIs のスクリーニングを行い、さらに解離定数の導出を試みた。
【方法】PCR 及び制限酵素を用いて HaloTag 融合 CNX (Halo-CNX)をコードするプラスミドベクターを作製し大腸菌に形質転換した。Halo-CNX 融合タンパク質の発現精製を行い、Halo リガンドを提示したセファロース粒子に Halotag を介して固定することで、CNX 固定粒子を作製した。同様に、HaloTag タンパク質のみを固定した粒子を調製し、コントロールとして用いた。7 種類の PDIs(ERp18, ERp27, ERp29, ERp44, ERp57, PDI, PDIp)を発現精製し、それぞれ固定粒子を用いたプルダウン実験に供した。プルダウン後、粒子に結合した PDI ファミリータンパク質を SDS-PAGE で評価した。さらに、タンパク質濃度とバンドの濃さを image J で数値化したプロットに対して、1:1 結合式のフィッティングを行い、解離定数を導出した。
【結果】ERp57 に対してプルダウンを行ったところ、CNX 固定粒子において会合が認められた。一方、CNX と相互作用しないことが知られている PDI においては会合が認められなかったことから、いずれの結果も既報と一致した。同様の方法により ERp18, ERp27, ERp29, ERp44, PDIp に対してプルダウンを行ったところ、ERp29 のみ会合が確認された。ERp29 および ERp57 の濃度を変化し、数値化したプロットに対してカーブフィッティングを行ったところ、それぞれ 1:1 結合理論式に良好なフィッティングを示した。また、理論式より推定された解離定数はそれぞれ 3.7 μM, 4.4 μM となり、おおよそ同程度の相互作用であることが示された。したがって、CNX は、ERp57 とほぼ同程度の強さで、ERp29 と複合体を形成することを明らかにした。

[1] M. Sakono et al., *BBRC* (2014), 452, pp.27-31
[2] Y. Matsuo et al., *Mol. Biol. Cell* (2009) 20, pp.4552-4562

Calnexin, Protein-protein interaction, Protein disulfide isomerase

発表責任者：迫野 昌文（msakono@eng.u-toyama.ac.jp）

講演番号：3J29p13
講演日時：3 月 19 日 17:20～ J 校舎 29 会場

CutA1 を用いた分子デザインによりタンパク質間相互作用検出を高感度化する方法
A method to increase protein-protein interaction detection sensitivity on solid substrate by molecular design utilizing CutA1 as the proteinaceous cushion
○今中 洋行、伊達 弘輝、石田 尚之、今村 維克（岡山大院自然）
○Hiroyuki IMANAKA, Koki DATE, Naoyuki ISHIDA, Koreyoshi IMAMURA (Okayama Univ.)

バイオ分子間相互作用を検出する技術は，医療，創薬，バイオテクノロジー等，幅広い分野で応用されている．その中心的な基盤技術要素として，リガンド分子の固定化が挙げられる．アナライト分子と効率的に相互作用させるため，リガンド分子は配向，構造，および密度を制御して固定化されることが重要となる．そこで，リガンド固定化基材に対して親和性を示すペプチドをタグとしてバイオ分子に挿入あるいは連結し，部位特異的固定化によって配向を制御する技術に着目して研究を行ってきた．本研究では，親和性ペプチドタグに加え，リガンド分子と固定化基材との相互作用による機能低下を緩和するクッションタンパク質として超好熱菌由来タンパク質 CutA1(Cut)を利用した固定化法の検討を行った．そして，分子デザインがリガンド分子の機能維持と相互作用検出に及ぼす影響を水晶振動子マイクロバランス法(QCM)により評価した．

固定化リガンドタンパク質としては抗 EGFP シングルドメイン VHH 抗体 (VHH)，親和性ペプチドとして金親和性ペプチド (Au3)，スペーサーとして E/K coiled-coil を用い様々にデザインした各種リガンドバイオ分子を調製した．まず QCM センサーチップ表面への各種リガンドタンパク質の固定化に関し，振動数変化とリガンドの分子量より見かけの固定化密度を算出したところ，推定占有面積が小さい分子ほど高密度に固定化されることが示唆された．また，アナライト分子である EGFP を添加し,相互作用を検出した結果，VHH の固定化形態により相互作用検出量に顕著な差がみられた．まず，物理吸着（VHH）では相互作用検出量は少なかったが，Au3 の連結(VHH-Au3)により検出量の向上がみられ，配向制御が重要であることがわかった．さらに，CutA1 をクッションタンパク質として用い，CutA1 内に VHH を挿入(Cut_N-VHH-Cut_C-Au3)することで検出感度の向上が見られ，VHH の構造維持が考えられた．しかし，E/K-coil を挿入(Cut_N-E-VHH-K-Cut_C-Au3)すると相互作用検出量が低下したことから，VHH の構造変化が示唆された． 一方，VHH を C 末端に連結(Cut_N-Au3-Cut_C-VHH)した場合，物理吸着と比べ顕著な検出量向上が見られ，VHH の構造維持が可能であることがわかった．これらの結果より，CutA1 の利用によってリガンドの配向制御，機能維持，均一かつ高密度に固定化ができる共に，相互作用検出の高感度化が可能であることが示された．

immobilization, biosensing, proteinaceous cushion

発表責任者：今中洋行（imanaka@okayama-u.ac.jp）

講演番号：3J30a01
講演日時：3 月 19 日 09:20～ J 校舎 30 会場

# インフルエンザウイルスの高頻度変異膜タンパク質に対する新規阻害剤スクリーニング系の考案

# Development of an inhibitor screening system for frequently mutated membrane proteins of influenza virus

○西岡 良将、里村 淳、青木 航、黒田 浩一、植田 充美（京大農）
○Ryosuke NISHIOKA, Atsushi SATOMURA, Wataru AOKI, Kouichi KURODA, Mitsuyoshi UEDA (Kyoto Univ.)

【背景と目的】
インフルエンザウイルスの感染には、ヘマグルチニン(HA)とノイラミニダーセ(NA)の二種類の主要な膜タンパク質が関与している。これらの膜タンパク質の高い変異率により、H5N1 亜型のような高病原性の新型インフルエンザウイルスの出現も報告されている。また、インフルエンザ薬として現在最も使われている NA 阻害剤（タミフル）への耐性をもった本ウイルス変異体の出現も報告されている。したがって、高頻度に変異する本ウイルスに対し、迅速に対応可能である新規な阻害剤スクリーニング方法を構築する必要がある。我々は、これまでに細胞表層工学によって HA 及び NA 変異体の高速生産系と阻害剤評価系を創製してきた[1, 2]。本研究では、インフルエンザウイルスの膜タンパク質とその変異体を細胞表層に提示した酵母[3]とファージペプチドディスプレイを組み合わせることで、新規薬剤開発を目指すスクリーニング系を構築した。
【方法と結果】
酵母表層上のタンパク質とファージ上のペプチドの結合の可能性を確かめるために、HA 提示酵母と既知の HA 結合ペプチドファージ[4]を用いてバインディングアッセイを行った。その結果、ファージ上の HA 結合ペプチドと酵母表層上の提示 HA が結合することを確認し、酵母表層工学とファージペプチドディスプレイを組み合わせた新規の阻害剤スクリーニングが可能であることが判明した。そこで、この系を用いて活性評価の簡便な NA に対する新しい阻害剤候補のペプチドを取得するため、アミノ酸配列をランダム提示しているファージペプチドライブラリーと酵母表層上で提示活性を有する NA を用いて阻害剤スクリーニングを試みたので、それらをまとめて報告する[5]。

[1] Yamada J *et al*. Influenza and RNA Viruses: Emergence, Classification and Management (Nova science publisher), 91-100 (2014)
[2] Nishioka R, *et al*. AMB Express, 6:8 (2016)
[3] Kuroda K, *et al*. Methods Mol Biol, 1152, 137-155 (2014)
[4] Matsubara T, *et al*. J Med Chem, 53, 4441–4449 (2010)
[5] Nishioka R, *et al*. submitted

Influenza virus, Cell surface engineering, Frequent mutation

講演番号：3J30a02
講演日時：3 月 19 日 09:35～ J 校舎 30 会場

# 活性型組換え蛋白質収量を増大させるレアコドンへの同義置換

# A positive effect of synonymous mutation on recombinant protein production

○河原崎 泰昌、田中 翔大、中野 祥吾、伊藤 創平、伊藤 圭祐（静県大食栄）
○Yasuaki KAWARASAKI, Shota Tanaka, Shogo Nakano, Sohei Ito, Keisuke Ito (Univ. Shizuoka)

【背景と目的】組換え蛋白質・酵素の発現量増大を目的として発現宿主のコドン使用頻度に合わせて蛋白質コード領域のコドンを最適化する Codon optimization は、コドン診断 Web サイトの充実および遺伝子全合成の容易化により多くの実績を残している。一方、進化工学的手法を用いて高温高フォールディング能を獲得した GFP 変異体群を取得した（昨年度本大会で発表）ところ、野生型 GFP のコドンから発現宿主（大腸菌および出芽酵母）特有の“レアコドン”に置換された変異が有効変異として集積した。そこで我々は、レアコドン化が発現蛋白質のフォールディングに与える影響を調べることを目的として検討をおこなった。

【方法】発現宿主として出芽酵母、ベクターとして銅イオン誘導性プロモーター（Cup1 プロモーター）を有する一般的な 2 μ プラスミドを用い、各種 GFP 改変体を組換え出芽酵母内で増殖連動的に発現（37℃、24 時間）させた。活性型発現した GFP 量は、菌体あたりの蛍光量（Ex=390, Em=510）を測定することにより行った。菌体内 GFP 蛋白質量は、特異的抗体を用いたウェスタンブロッティングにより評価した。

【結果と考察】Thr203(aca)を他の同義コドンに置換したところ、レアコドンである acg に置換した場合にのみ活性型 GFP の発現量の増大が見られた。またこの置換は、菌体内 GFP 蛋白質量の増大を伴っていた。他の Thr(aca)コドンを同様にレアコドン化して調べたところ、Thr203 を含む一部の置換のみが発現量の増大をもたらした。この結果は、菌体内 GFP 蛋白質量と概ね相関した。Thr203 周辺のコドン（Leu201(cug), Ser202(ucc), Ser205(ucu), Ala306(gcc)）をレアコドン化したところ、酵母中で最もコドン使用頻度が低い L201(cug-cuc)置換体が Thr203(aca)置換体に匹敵する発現量増大をもたらした。この活性型 GFP 発現量増大は、低温（30℃）発現系では顕著とならなかった。以上より、レアコドン化による活性型蛋白質発現量増大は、翻訳途上のリボソームがレアコドン上で暫時停止（または減速）することで、リボソームから排出された新生ポリペプチド鎖の自発的 co-translational folding が促進されたため、と推測した。

rare codon, co-translational protein folding, directed evolution

発表責任者：河原崎泰昌（kawarsky@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：3J30a03
講演日時：3 月 19 日 09:50～ J 校舎 30 会場

# 人工的な代謝酵素複合体のゲノム遺伝子導入によるポリケチド化合物の微生物生産

# Microbial production of a polyketides by genomic integration of artificial metabolon.

○吉越 健輔[1]、石澤 崇昭[1]、篠田 優[1]、平野 勝紹[1]、鮒 信学[2]、春木 満[1]、平野 展孝[1] ([1]日大・工・生命応用化、[2]静岡県立大・食栄・食品生命科学)
○Kensuke YOSHIKOSHI[1], Takaaki Kokuzawa[1], Suguru Shinoda[1], Katuaki Hirano[1], Nobutaka Funa[2], Mitsuru Haruki[1], Nobutaka Hirano[1] ([1]Nihon Univ., College of Eng., Dept. of Chem. Biol. & Appl. Chem., [2]Univ. of Shizuoka, Dept. of Food & Nutritional Sci.)

天然のポリケチド化合物には、ウコンのクルクミンや、ブドウのレスベラトロールなど、抗腫瘍作用や抗酸化作用等の様々な生理活性を持つものが数多く存在する。近年、有用生理活性を持つこれらの誘導体の微生物生産が注目されている。従来のマルチプラスミド法では、各プラスミド間のコピー数の違いによって、生合成遺伝子の発現量に違いが生じるため、多種類の生合成酵素が反応に関与する生合成系への適用の際に問題が生じる場合が有る。本研究では、放線菌ファージ TG1 由来部位特異的組換え酵素（インテグラーゼ）を用いて、大腸菌ゲノムの特定部位へ導入した生合成遺伝子オペロンからの、効率的な物質生産を目標とした研究を行った。一般に、ゲノムへ生合成遺伝子を導入した場合、プラスミドへ導入した場合に比べて遺伝子発現量が低下する傾向にあるため、生合成酵素を複合体化することで、少量の遺伝子発現量であっても効率的な生合成反応を可能とする手法の開発を目指した。

これまでに、TG1 インテグラーゼを用いた大腸菌ゲノムへの遺伝子導入に関する研究から、高効率に遺伝子導入可能なゲノム上部位 5 ヵ所を特定している。これらのゲノム部位を対象に、比色定量可能なポリケチド化合物である、放線菌が生産する赤色色素フラビオリンの生合成遺伝子の導入を行った。TG1 インテグラーゼを用いて、大腸菌ゲノムへフラビオリン生合成遺伝子を導入し、プラスミドに生合成遺伝子を導入した場合と、生合成量を比較した結果、いずれのゲノム部位に導入しても、プラスミドに生合成遺伝子を導入した場合と比較して、合成量が約 1/2 に低下する結果を得た。そのため、ゲノムに生合成遺伝子を導入した場合でも、生合成量を減少させない手法として、生合成酵素の複合体化（メタボロン形成）による基質チャネリング効果の創出を目指した。基質チャネリング効果とは、生合成酵素が複合体化することで、各酵素間で代謝中間体の受け渡しが円滑に行われることにより、生合成反応が効率良く進行する効果を指す。本研究では、植物バイオマス分解酵素複合体（セルロソーム）の骨格タンパク質―酵素間相互作用を利用して、フラビオリン生合成酵素の複合体化を行い、大腸菌ゲノムに複合体遺伝子を導入した際の生合成量を検討した。その結果、フラビオリン生合成酵素を複合体化した場合、ゲノムに遺伝子導入した場合でも、プラスミドに遺伝子導入した場合と同程度まで、フラビオリン生合成量が上昇することを確認した。

artificial metabolon, polyketide, serine-type integrase

発表責任者：吉越　健輔（ykensuke@chem.ce.nihon-u.ac.jp）

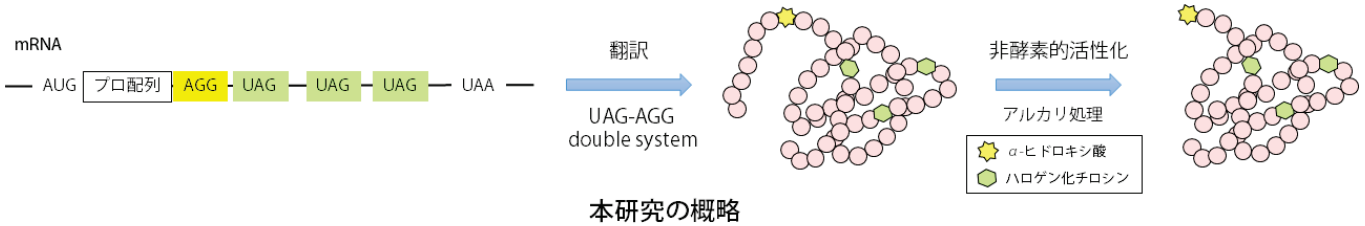
講演番号：3J30a04
講演日時：3 月 19 日 10:05～ J 校舎 30 会場

# 二種非天然型アミノ酸同時導入による非酵素的活性化可能な安定化トランスグルタミナーゼの生産

# Production of non-enzymatically activatable stabilized microbial transglutaminase by simultaneous introduction of two nonnatural amino acids

○大竹 和正[1]、春名 健一[2]、坂本 健作[1] ([1]理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター、[2]味の素株式会社 イノベーション研究所)
○ Kazumasa OHTAKE[1], Ken-ichi HARUNA[2], Kensaku SAKAMOTO[1] ([1]RIKEN CLST, [2]INSTITUTE FOR INNOVATION, AJINOMOTO CO., INC.)

我々はこれまでに大腸菌のゲノムエンジニアリングを通じて翻訳終結因子 1(RF-1)遺伝子破壊株の作成を可能にし、翻訳終結から非天然型アミノ酸へと UAG コドンの意味を完全に書き換えること(コドン再定義)に成功している[1,2]。RF-1 遺伝子破壊株を用いることにより、従来法では実現困難であった部位特異的多数箇所へと非天然型アミノ酸を導入したタンパク質の生産が可能となった。この株を用いたタンパク質中の多数箇所へのハロゲン化チロシン導入がタンパク質安定化法として利用可能なことを報告している[3]。また、大腸菌における最も使用頻度の低いセンスコドンである AGG アルギニンコドンを、非天然型アミノ酸の一種であるホモアルギニンへと再定義することも可能にしている[4]。これらの知見を融合することにより、UAG コドンと AGG コドンを異なる非天然型アミノ酸へと再定義し二種類の異なる非天然型アミノ酸を同時にタンパク質へと導入する手法の開発を進めている。前大会では、ハロゲン化チロシンとα-ヒドロキシ酸を各一箇所ずつトランスグルタミナーゼ(TG)へ同時導入した結果について報告した。その後の研究の進展により、複数箇所へのハロゲン化チロシン導入による TG の熱安定化並びに、ハロゲン化チロシンとα-ヒドロキシ酸の同時導入による非酵素的活性化可能な安定化 TG の生産を可能としたので本発表で報告する。



本研究の概略

1. Mukai, T. et al., “Codon reassignment in the *Escherichia coli* genetic code” *Nucleic Acids Res.* **2010**, 38 (22), 8188-95
2. Mukai, T. et al., “Highly reproductive *Escherichia coli* cells with a blank assignment for the UAG codon” *Sci. Rep.* **2015**, 5, 9699
3. Ohtake, K. et al., “Protein stabilization utilizing a redefined codon” *Sci. Rep.* **2015**, 5, 9762
4. Mukai, T. et al., “Reassignment of a rare sense codon to a non-canonical amino acid in *Escherichia coli*” *Nucleic Acids Res.* **2015**, 43(16), 8111-22

protein engineering, nonnatural amino acid, codon reassignment

発表責任者：大竹 和正（kazumasa.ohtake@riken.jp）

講演番号：3J30a05
講演日時：3 月 19 日 10:20～ J 校舎 30 会場

# 有用酵素の基質特異性改変とバイオイソプレン生産への応用

alternation of substrate specificity for Bio-isoprene production

○折下 涼子、白井 智量、近藤 昭彦（理研 CSRS）
○RYOKO ORISHIMO, TOMOKAZU SHIRAI, AKIHIKO KONDO (Riken CSRS)

イソプレンはナフサ熱分解の副生成物として工業的に生産され、自動車タイヤなどに使われる合成ゴム（ポリイソプレンゴム）の原料として使用される。バイオマス原料からの発酵によるイソプレン生産が可能となれば、石油への依存度低減、地球温暖化の原因とされる二酸化炭素削減が期待できる。

イソプレンは天然ゴム（ポリイソプレン）のモノマーとして、また、二次代謝産物の構造単位として幅広い生物の細胞内に存在しうる物質であるが、その代謝経路は多くの酵素と ATP を必要とするため、効率のよい発酵生産のためには新たな生合成経路の導入が望まれる。

理研では「in silico 代謝設計技術」（独自に開発した非天然の反応を予測するツール：BioProV）を用いて人工代謝経路を設計し、メバロン酸を経由し効率よくイソプレン発酵生産を行うための生合成経路を見出した。メバロン酸からイソプレンを生産するためには本来 5 つの酵素と 3 つの ATP が必要であるが、我々の見出した生合成経路を用いれば 2 つの酵素と 1 つの ATP だけでイソプレンの生合成が可能になる。そこで、我々は経路に沿った反応を行う酵素の探索と酵素の基質特異性の改変を行い、野生型酵素に比べイソプレン生産能力の高い変異体を見出した。

今年度、実用化に向けさらなる酵素改変を行い、高活性酵素を得たのでここに報告する。

isoprene, mevalonate, substrate specificity

講演番号：3J30a06
講演日時：3 月 19 日 10:45～ J 校舎 30 会場

# MMLV逆転写酵素、耐熱型DNAポリメラーゼおよびDNA/RNAヘリカーゼの組み合わせによるRNAの高感度検出

# Enhanced detection of RNA by MMLV reverse transcriptase coupled with thermostable DNA polymerase and DNA/RNA helicase

岡野 啓志[1]、片野 裕太[1]、馬場 美聡[1]、藤原 綾子[2]、秀瀬 涼太[2]、藤原 伸介[2]、柳原 格[3]、宇治家 武史[4]、林 司[4]、兒島 憲二[1]、滝田 禎亮[1]、○保川 清[1]（[1]京大院農、[2]関西学院大、[3]母子センター、[4]カイノス）

Hiroyuki OKANO[1], Yuta KATANO[1], Misato BABA[1], Ayako FUJIWARA[2], Ryota HIDESE[2], Shinsuke FUJIWARA[2], Itaru YANAGIHARA[3], Takeshi UJIIE[4], Tsukasa HAYASHI[4], Kenji KOJIMA[1], Teisuke TAKITA[1], ○Kiyoshi YASUKAWA[1]（[1]Kyoto University, [2]Kwansei-Gakuin University, [3]Osaka Medical Center and Research Institute for Maternal and Child Health, [4]Kainos Laboratories, Inc.）

【目的】cDNA合成は、鋳型RNAがつくる二次構造およびRTの不安定性により、感度あるいは正確性（正しいヌクレオチドを取込む性能）がDNA合成に及ばない。近年、MMLV RTにおいて、鋳型プライマーとの結合領域に存在し側鎖が負電荷を有する残基（E286、E302）が正電荷を有する残基に、分子表面に存在する疎水性残基（L435）が電荷を有する残基に、RNase H活性の触媒残基（D524）がAlaにそれぞれ置換されることにより耐熱性が向上した変異体E286R/E302K/L435R/D524A（MM4）が開発された[1)]。また、高い耐熱性と校正活性を有する好熱性細菌*Thermotoga petrophila* K4株由来ファミリーA DNAポリメラーゼ（K4pol）において、RNAとの結合でリボース2'位水酸基と立体障害を起こすと予測されたL329がAlaに置換されることにより逆転写活性を獲得した変異体K4pol$_{L329A}$が開発された[2)]。さらに、超好熱性アーキア*Thermococcus kodakarensis*由来スーパーファミリー2のDNA/RNAヘリカーゼである*Tk*-EshAが、PCRで見られる非特異的増幅を軽減させることが見出された[3)]。本研究では、MM4、K4pol$_{L329A}$、*Tk*-EshAを組み合わせることにより、RNAの二次構造やプライマーのミスアニールをなくすことによる高感度なcDNA合成技術の開発を試みた。

【方法と結果】これまで知られているMM4、K4pol$_{L329A}$、*Tk*-EshAの最適反応条件はそれぞれ異なる。我々は品質工学の技法を用いて、嘔吐型セレウス菌の毒素であるセレウリド合成遺伝子*cesD*のmRNAをモデルRNAとして、16のパラメーター（MM4、K4pol$_{L329A}$、*Tk*-EshA、dNTP、KCl、Tris-HCl、bicine-NaOH、$MgCl_2$、$Mn(OCOCH_3)_2$、$CH_3COOK$、トレハロース、ATP、大腸菌RNA、プライマー、グリセロールの各濃度および反応温度）を最適化した。その結果、MM4だけを用いたcDNA合成と比較して、感度が100～1000倍向上した。このことから、これら新規３酵素の組み合わせがcDNA合成反応に有用であることが示唆された[4)]。

【文献】1. K. Yasukawa et al. *J. Biotechnol.* **150**, 299−306 (2010)
2. S. Sano et al. *J. Biosci. Bioeng.* **113**, 315−321 (2012)
3. A. Fujiwara et al. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**, 3022−3031 (2016)
4. H. Okano et al. *Enzyme Microb. Technol.* **96**, 111−120 (2017)

reverse transcriptase, DNA polymerase, helicase

発表責任者：保川清（yasukawa@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3J30a07
講演日時：3 月 19 日 11:00～ J 校舎 30 会場

# 小型 SPR センサを用いた食中毒菌の新規判定法における非対称 PCR 法の最適条件の検討

# A study of optimal conditions of asymmetric polymerase chain reaction for the detection of food pathogenic bacteria using a personal SPR-Sensor

○長井 晴香[1]、冨岡 寛治[1]、東 信哉[2]、岩倉 宗弘[2]、奥村 史朗[3] ([1]久留米高専、[2]九州計測器、[3]福岡県工技セ)
○ Haruka NAGAI[1], Kanji TOMIOKA[1], Shinya AZUMA[2], Munehiro IWAKURA[2], Shiro OKUMURA[3] ([1]NIT, Kurume College, [2]Kyushu Keisokki, [3]Fukuoka ITC)

[目的]
食のグローバル化に伴い、日本の食品メーカーでは HACCP に基づく食品の製造過程や加工過程を連続的に監視する総合衛生管理製造過程認証制度が導入されつつあり、食中毒菌を含む微生物検査の実施が求められている。選択培養法を始めとする微生物検査は、判定までに数日間を要し、判定時間の短縮が望まれている。我々は小型の表面プラズモン共鳴(SPR)センサを用いた食中毒菌判定法の開発を進めており、サンプルを前培養した後、非対称 PCR 法を用いて食中毒菌に特異的な遺伝子を増幅し、SPR センサのセンサチップに固定化された相補的なプローブとのハイブリダイズを結合応答(RU 値)として検出する方法により、迅速で高精度な判定を目指している。RU 値は一本鎖 DNA 濃度に依存するため、一本鎖 DNA と二本鎖 DNA の両方を含む非対称 PCR 産物中の一本鎖 DNA と RU 値との相関をとり、新規食中毒菌判定法における非対称 PCR 最適条件の検討を試みた。
[方法および結果]
黄色ブドウ球菌の病原性の原因である thermostable nuclease 遺伝子の DNA 配列を対象にして標準サンプルとして 138mer の Forward 鎖(F 鎖)と Reverse 鎖(R 鎖)を合成し、ODS カラム (Triart C18, YMC 製)を用いて逆相クロマトグラフィーを行い、一本鎖 DNA の定量法について検討した。移動相はアセトニトリルと TE Buffer(pH 7.4)を、検出器は UV(254nm)を用い、流速は 1.0 ml/min、カラム温度を 50℃に設定し、F 鎖と R 鎖を別ピークとして検出・定量してその濃度差を一本鎖状態の F 鎖濃度とした。標準サンプルを用いた検討において、R 鎖のピーク面積は F 鎖濃度への依存が見られ、本条件では F 鎖と R 鎖との間に相互作用が生じていることが示唆されたため、F 鎖濃度に応じて R 鎖検量線を補正することにより F 鎖と R 鎖をそれぞれ定量することが可能となった。次に、条件を変えて非対称 PCR を行い、その増幅産物について小型 SPR センサによる RU 値を測定したところ、サンプル中の一本鎖 DNA と RU 値との間には正の相関が見られ、一本鎖 DNA の定量値から最適なサンプル調製法を決定できると考えられた。
[まとめ]
HPLC による一本鎖 DNA 定量法において、F 鎖濃度に応じて R 鎖の検量線を補正することで有用な一本鎖 DNA の定量法を確立できた。また、本定量法により食中毒菌判定のための非対称 PCR 条件を容易に決定することが可能となった。

surface plasmon resonance, food pathogenic bacteria, HPLC

発表責任者：長井晴香（h.nagai1220@gmail.com）

講演番号：3J30a08
講演日時：3 月 19 日 11:15～ J 校舎 30 会場

# 大腸菌発現システムを用いたシングルヒト B 細胞からの抗乳酸菌ヒトモノクローナル抗体取得

# Screening of anti Lactobacillus bulgaricus human antibody from single human B cells using E.coli expression systems.

○内田 由乃、加藤 晃代、兒島 孝明、中野 秀雄（名大農）
○Yoshino Uchida, Teruyo Kato, Takaaki Kojina, Hideo Nakano (Nagoya Univ.)

【目的】
モノクローナル抗体（MAbs）は病気の治療や診断に必須であり、近年その用途はますます拡大している。しかしハイブリドーマ法やファージディスプレイ法等の従来法では新規 MAbs の取得に長い時間を要する。一方、我々の研究グループは、動物の末梢血から得られる B 細胞から、一細胞逆転写反応と PCR により MAbs 遺伝子を増幅し大腸菌無細胞タンパク質合成系で高速にスクリーニングし、さらに得られた MAbs を大腸菌にて生産可能な「Ecobody 法」を開発してきた。そこで本研究では、1)ヒト B 細胞からの Ecobody 法確立および 2)免疫系に大きく関与することの知られる腸内細菌に対するヒト抗体の解析を目的とし、EB ウイルス不死化ヒト B 細胞からのヒト抗体取得条件を検討した。
【方法・結果】
まず、理化学研究所細胞バンクより入手した不死化ヒト B 細胞群から、ヨーグルト生産菌である乳酸菌 *Lactobacillus bulgaricus* に対し、結合能を有する細胞を選択した。まず *L. bulgaricus* 死菌体をコートした磁気ビーズにより細胞を濃縮後、小胞体染色蛍光試薬により染色し、セルソーターを用いて、約 1 %の細胞をセレクションした。目的の細胞は 96well プレートに 1cell / well になるように分注した。その後抗体遺伝子特異的プライマーによる逆転写反応および 2 段階の PCR を行ったところ、遺伝子の増幅が確認できた。得られた MAbs 遺伝子を解析したところ、いずれも新規 CDR を含む遺伝子であった。また、大腸菌無細胞タンパク質合成系において MAbs を合成し SDS-PAGE および ELISA にて抗体性能を解析したところ、目的サイズのタンパク質生産と抗原 *L. bulgaricus* に対する結合活性がみられた。取得した抗体は、*L. bulgaricus* と比較し低いものの、大腸菌 O157 無毒株および大腸菌 BL21(DE3)株に対しても結合活性を示した。現在得られた抗体の結合特異性を詳細に検討している。

antibody, cell-free protein synthesis, Lactobacillus bulgaricus

発表責任者：中野秀雄（hnakano@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3J30a09
講演日時：3 月 19 日 11:30～ J 校舎 30 会場

# 緑膿菌 OprM LOOP2 に対する組換え単鎖抗体の大腸菌発現に向けた試み

# Experiments for expressing recombinant single chain variable fragment against *Pseudomonas aeruginosa* OprM LOOP2 in *Escherichia coli*

○矢野 遥香、宮崎 未有、良原 栄策、小島 直也、笹川 昇 (東海大)
○Haruka YANO, Miyu MIYAZAKI, Eisaku YOSHIHARA, Naoya KOJIMA, Noboru SASAGAWA (Tokai Univ.)

緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)の多剤排出ポンプは、3 つのタンパク質(MexA、MexB、OprM)により構成されている。菌体内に入った抗生物質などの薬剤はこのポンプによって菌体外へ排出され、その結果として緑膿菌は多剤耐性能を獲得していると考えられる。したがって、この多剤排出ポンプの機能抑制が可能になれば、緑膿菌感染症の治療法開発に繋がると期待される。

当研究室では、多剤排出ポンプを構成する 3 つタンパク質のうち、OprM に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから抗体遺伝子の可変領域(VH、VL)をクローニングし、それを用いて組換え単鎖抗体を作成することを目指して実験を行っている。使用したハイブリドーマは、緑膿菌の多剤排出ポンプを構成する OprM タンパク質が細胞外に面している領域(LOOP2)のアミノ酸配列をエピトープとしたものである。これまでに、このハイブリドーマから全 RNA を抽出し、オリゴ dT プライマーを用いた逆転写反応により cDNA を合成したのちに、これを鋳型として 5’-RACE 法を用いて抗体遺伝子の可変領域(VH、VL)をクローニングした。

今回は、取得した VH、VL がリンカー配列を挟んで順番に連結された単鎖抗体遺伝子発現プラスミドの構築を行った。VH、VL に対し、その間にリンカー配列(GGGGSGGGGSGGGGS、G4S3 と略す)が挟まるような構造の組換え遺伝子をデザインし、その構築のためのプライマーを設計した。プライマーにあらかじめ付加配列をつけておくことにより、まず VH、VL にリンカーの一部が融合した PCR 断片を作製し、更にその両者を用いて VH、VL がリンカー配列を挟んで順番に連結された PCR 断片を獲得した。この断片を、VH と VL の順番に応じて各々VH-(G4S3)-VL、VL-(G4S3)-VH と名付けた。

次に VH-(G4S3)-VL、VL-(G4S3)-VH ともに、pET16b を用いた発現コンストラクトの構築を試みた。まずこのコンストラクトを大腸菌 XL-1 blue に導入し、陽性クローンの選別、プラスミドの抽出を行ったのち、大腸菌 BL21(DE3)に形質転換させた。この大腸菌 BL21(DE3)に対し、IPTG で発現誘導を行ったのちに菌体を回収し、SDS-PAGE に供した。

これまでのところ、VH-(G4S3)-VL/pET16b の発現は確認されなかった。理由としてリンカー配列のコドン使用頻度の可能性も考えられたため、新たにリンカー配列を設計しなおして再度コンストラクトの構築及び発現実験を行ったが、これも発現を確認することができなかった。現在、ベクターを His-Tag 系から GST 系への変更を進めているほか、大腸菌株の検討、発現誘導条件の検討など、目的とした組換え単鎖抗体タンパク質を発現させるべく条件検討を行っている。

*Pseudomonas aeruginosa*, single-chain variable fragment, Multidrug efflux pump

講演番号：3J30a10
講演日時：3 月 19 日 11:45～ J 校舎 30 会場

# 標準 RNA を用いた調製 RNA 溶液の分解性評価法に関する研究

# Study about method for evaluating degradability of extracted RNA using standard RNA

○長谷川 丈真[1]、高橋 淳子[2]、岩橋 均[1] ([1]岐阜大、[2]産総研)
○Takema HASEGAWA[1], Junko TAKAHASHI[2], Hitoshi IWAHASHI[1] ([1]Gifu Univ., [2]AIST)

生物試料を起源として抽出された RNA は一般的に分解されやすいと言われている。そのため、リアルタイム PCR やマイクロアレイ解析，RNAseq など，mRNA に着目して細胞の生理学的状態を観察する実験を行う際は、調製 RNA 溶液のクオリティコントロールを正確に行うことが重要である。現在一般的に行われている調製 RNA 溶液のクオリティコントロール方法として、rRNA の検出や定量により、分解度からクオリティを評価する方法や、吸光度による純度測定(A260/A230，A260/A280)などが挙げられる。しかし、これらの方法は、目的である mRNA の分解度や調製 RNA 溶液に含まれる不純物による定量実験への影響を直接評価しているわけではない。そこで本研究では、これらの要素を直接評価できる可能性を持つ､外部標準 RNA(以下標準 RNA)を用いた新しい調製 RNA 試料のクオリティコントロール方法を確立することを目的とする。

各生物種によって、細胞内での RNA 分解様式は異なる。例えば真核生物では、エキソソームによって RNA は末端から分解される。一方、原核生物は、エキソソームを持っておらず、RNA は遊離 RNase によってランダムに、または末端から分解される。このように、生物ごとに持っている RNase の種類や量は異なっていて、RNA の分解様式には、生物ごとに RNA の領域や構造によって偏りがあると考えられる。そのため、調製 RNA が、調製サンプルが持つ RNase によって分解されていた場合、RNA の構造や領域ごとに偏った分解を受けている可能性がある。そこで本研究ではこの RNA 分解様式の偏りに着目した。もし抽出サンプルの RNase による RNA 分解様式に偏りがある場合、分解されやすい領域と分解されにくい領域の存在比を測定することにより、調製 RNA の分解度を評価できる可能性がある。標準 RNA は、産業総合研究所が核酸標準物質として開発した「定量解析用リボ核酸(RNA)水溶液」を用いた。この標準 RNA は 5 種類あり、濃度既知で、自然界に存在する生物のゲノムと相同性が低い配列に設計されている。

本研究では、モデルサンプルとして、酵母や大腸菌、マウスの血液や各種臓器を使用した。RNA 分解に偏りがあるか調べるために、各サンプルに各標準 RNA 溶液を添加し、標準 RNA を分解させた。その後、標準 RNA 上の 5’末端や中央、3’末端の各領域の残存率を、リアルタイム PCR を用いて測定した。結果、モデルサンプル毎に、RNA の分解様式が異なることが分かった。今後、この分解様式の違いを利用した具体的な RNA の分解評価法を検討する。

RNA quality control, RNA degradation, Standard RNA

講演番号：3J30p01
講演日時：3 月 19 日 14:00～ J 校舎 30 会場

絹タンパク質セリシン加水分解物の細胞培養添加剤としての作用機構
Mechanism of SERICIN on Mammalian Cell Culture
○寺田 聡[1]、神道 紀志[1]、高橋 潤[2]、佐々木 真宏[2]([1]福井大工、[2]セーレン)
○ Satoshi Terada[1], Noriyuki Shindoh[1], Jun Takahashi[2], Masahiro Sasaki[2] ([1]Univ. Fukui, [2]SEIREN)

哺乳動物細胞の体外培養では、培養中に細胞機能を維持し、細胞増殖を促進するための「増殖因子」が重要である。とくに、再生医療では多様な細胞が利用されることから、性質の異なる細胞に対して個別の添加剤が開発されねばならない。そのような、多様な細胞に有効な因子として、われわれは、絹タンパク質セリシン加水分解物（以下セリシン）が多様な培養細胞に対して増殖因子活性を持っており、昨年度の農芸化学会では iPS 細胞の増幅に有効であることを報告した。

今年度の本研究では、セリシンの作用機構の解明をめざした。具体的には、上皮成長因子（EGF）依存性ヒトケラチノサイトのある株を対象に検討した。この株では、EGF 不在下でもセリシン添加で増殖できることから、EGF シグナリングとの関連でセリシンのシグナリング経路の解明を目指すことにした。シグナリングの阻害剤を用いて、増殖促進作用が維持されるか消失するかで評価することとした。

セリシンによる細胞増殖促進効果は、EGF 受容体に対する中和抗体によって有意に阻害された。次に、MAPK 経路を阻害すると、EGF と同様にセリシンの促進効果も阻害された。同様に、JAK-STAT 経路の阻害でも、EGF とセリシンともに増殖促進効果が減少した。しかし、PI3K 経路を阻害した場合、セリシンの増殖促進効果は阻害されたが、EGF の増殖促進効果は阻害されなかった。

すなわち、セリシンは EGF と同様の機構で増殖促進をしているものの、別の経路をも活性化しているのではないかと思われた。そこで、もう少し詳細に、セリシンの増殖促進作用を検討することとした。このケラチノサイトは、EGF に加えて、BPE が共存しているとより活発に増殖する。そこで、「EGF と BPE の同時添加」、「EGF のみの添加」、「BPE のみの添加」、「セリシンのみの添加」、「無添加」の５つの条件で比較した。その結果、因子添加後、速やかに細胞増殖促進効果が認められたのは、「EGF と BPE の同時添加」と「セリシンのみの添加」であり、「EGF のみの添加」では増殖促進効果は数日経過してからしか認められなかった。すなわち、セリシンには EGF の作用に加えて、BPE 様の効果があるのではないかと思われる結果が得られた

以上より、セリシンでは EGF 経路に加えて他の経路も重要な役割を果たし、EGF よりも多様な機能を有する因子として利用できることが期待される。

sericin, EGF, mammalian cell

発表責任者：寺田　聡（terada@u-fukui.ac.jp）

講演番号：3J30p02
講演日時：3 月 19 日 14:15～ J 校舎 30 会場

生体分子複雑系の非分離解析技術高度化
Advancement of analytical methodology toward unpurified biomolecular complexity
○菊地 淳[1,2,3]、坪井 裕理[1]、伊藤 研悟[2]、伊達 康博[1,2]([1]理研環境資源、[2]横市院生命医、[3]名大院生命農)
○Jun KIKUCHI[1,2,3], Yuuri TSUBOI[1], Kengo ITO[2], Yasuhiro DATE[1,2] ([1]RIKEN CSRS, [2]Yokohama City Univ., [3]Nagoya Univ.)

生物資源を人間が活用する際は、大別して目的成分のみを分離する場合と、未分離のまま利用する場合がある 1)。例えば、殆どの食品は生物資源の可食部を未分離で食することで、複雑な混合物中のアミノ酸や糖類などから、豊かな味わいを楽しむことができる 2)。一方で健康に有用とされる物質のみを分離して、サプリメントなどで摂取することも可能ではあるものの、分離プロセスに大量の試薬やエネルギーを投入するため、最終製品は高価になってしまう。人類史を辿ると、水陸の有用生物種から材料、食料、飼料等々の物質生産が行われてきた。こうした生物生産は持続的・循環的であることが望まれる。有用試料の特性をいち早く解析するためには、その特徴抽出を可能とするデータサイエンス技術が有用となる 3)。特に、カラム利用無しに混合物のまま解析できれば、究極的には実験室の無い食品工場や、生産現場での品質評価も可能になる。筆者らが試みているような農林水産資源を簡易評価する際に、データの再現性が極めて高く、試料調製の過程が簡略な NMR 法はポテンシャルがある 4)。カラム分離を用いない大きな利点は、試料調製と計測法を一定にしておけば、数年も前の過去のデータと一緒に解析することが可能な点が挙げられる 5)。例えば、ヒトの生活習慣は数日から数か月の栄養や運動状況の変化で徐々に変化するため、時系列採取した尿などの排泄物で恒常性破綻を迅速に診断できる可能性がある 6)。農林水産物や土壌・底泥といった環境試料も、やはり季節・年変動が必然であるために、一定の機器分析データが得られれば経年変動を客観的に評価できる 7)。さらに、永久磁石の小型で安価な NMR 装置を用いた簡易分析システムの研究も行われ始めており 8)、将来的には農林水産物の生産現場評価が可能となる時代が近づいている。年会では、これら一連の計測およびデータサイエンス技術高度化について紹介したい。

＜参考文献＞
1)菊地淳 (2016) *化学* 71, 35. 2)菊地淳 (2016) *フードケミカル*(in press) 3) Wei et al. (2015) *Anal. Chem.* 87, 2819; Motegi et al. (2015) *Sci. Rep.* 5, 15710; Ito et al. (2016) *ACS Chem. Biol.* 11, 1030 4)Kikuchi et al. (2016) *Anal. Chem.* 88, 659; Komatsu et al. (2016) *Angew. Chem. Int. Ed.* 55, 6000; Misawa et al. (2016) *Chem. Commun.* 52, 2964. 5)Misawa et al. (2016) *Anal. Chem.* 88, 6130. 6) Shiokawa et al. (2016) *Anal. Chem.* 88, 2714; Misawa et al. (2015) *J. Proteome Res.* 14, 1526. 7) Ito et al. (2014) *Anal. Chem.* 86, 1098; Asakura et al. (2014) *Anal. Chem.* 86, 5425; Yoshida et al. (2014) *Sci. Rep.* 4, 7005; Ogura et al. (2015) *ACS Chem. Biol.* 10, 1908;Ogura et al. (2016) *Sci. Rep.* 6, 28011. 8)Chikayama et al. (2016) *Metabolites* 6, 36.

NMR, Data science, Pattern recognition method

発表責任者：菊地淳（jun.kikuchi@riken.jp）

講演番号：3J30p03
講演日時：3 月 19 日 14:30～ J 校舎 30 会場

# バイオインフォマティクスを駆使したビッグデータ解析に基づく魚類多様性および環境応答多様性の評価への応用

# Evaluation of fish diversity and environmental responses using big data bioinformatics

○魏 菲菲[1]、福地 実[2]、朝倉 大河[1,2]、坂田 研二[1]、菊地 淳[1,2,3]（[1]理研 CSRS、[2]横市大院・生命医、[3]名大院・生命農）
○Feifei WEI[1], Minoru FUKUCHI[2], Taiga ASAKURA[1,2], Kenji SAKATA[1], Jun KIKUCHI[1,2,3] ([1]RIKEN Center for Sustainable Resource Science, [2]Grad. Sch. Medbio. Sci., Yokohama City Univ., [3]Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ.)

科学の発展は従来から各学術分野の大きなオープンプロブレムの解決を軸に成し遂げられてきた。これまでの生物学でも個別の課題に重心を置いた研究が行われてきたが、近年メタゲノムやメタボロームなどの大容量生物系ビッグデータが急速に蓄積され、その中には生物についての未知問題の解決につながるだけの十分な情報が含まれていると考えられる。そのため、次世代生物学はビッグデータ解析にバイオインフォマティクスを駆使したオープンプロブレムの解明が鍵となっている。
我々は着目する環境中から生物および環境的試料を採取し、各種分析機器（核磁気共鳴法、誘導結合プラズマ発光分光分析法、次世代シーケンサーなど）を用いて有機物群、無機物群および微生物群集のビッグデータを蓄積し、バイオインフォマティクスを駆使して生物－環境システムの特徴抽出を行う手法を構築してきた。(1-4)

本研究では、日本各地の沿岸および河口域等から採集した多様な魚類を研究対象とし、魚種の多様性（83 科 230 種 2115 個体）および単一魚種（マハゼ）の環境応答（29 生息地 3 年間サンプル採集 1022 個体）の多様性について、マーケットバスケット分析（5）や機械学習などのバイオインフォマティクスを駆使した統合的解析手法を用いて評価した。各魚種に対して、代謝物の方面から魚種の類縁度を評価し、単一魚種のマハゼに対して異なる生息環境に適応する際に相互作用のある代謝物、無機物および腸内微生物叢の応答ネットワークをピックアップして考察した。このような生物情報解析の新しい方向性を打ち出す試みを本会にて議論したい。

参考文献

(1) Wei, F.; Ito, K.; Sakata, K.; Date, Y.; Kikuchi, J. *Anal. Chem.* **2015**, 87, 2819-2826.
(2) Asakura, T.; Date, Y.; Kikuchi, J. *Anal. Chem.* **2014**, 86, 5425-5432.
(3) Asakura, T.; Sakata, K.; Yoshida, S.; Date, Y.; Kikuchi, J. *PeerJ* **2014**, 2, e550.
(4) Misawa, T.; Wei, F.; Kikuchi, J. *Anal. Chem.* **2016**, 88, 6130-6134.
(5) Shiokawa, Y.; Misawa, T.; Date, Y.; Kikuchi, J. *Anal. Chem.* **2016**, 88, 2714-2719.

bioinformatics, fish diversity, environmental response

講演番号：3J30p04
講演日時：3 月 19 日 14:45～ J 校舎 30 会場

深層学習に支援された代謝プロファイリング技術の構築
Metabolic profiling based on deep learning algorithm
○伊達 康博[1,2]、菊地 淳[1,2,3] ([1]理研 CSRS、[2]横市院生命医、[3]名大院生命農)
○Yasuhiro DATE[1,2], Jun Kikuchi[1,2,3] ([1]RIKEN CSRS, [2]Yokohama City Univ., [3]Nagoya Univ.)

【研究背景】　複雑な生体反応により生じる多種多様な代謝情報を俯瞰的に評価する代謝プロファイリング技術（メタボロミクス）は、食品の産地判別技術やバイオマーカーの探索等に応用されている。これら一連の解析におけるキーテクノロジーの一つがデータマイニングであるが、従来法（PCA や PLS 等）では“埋もれた情報”を発掘しきれないケースも多々あることから大きな問題が生じており、産地判別能の向上やバイオマーカーの効率的な探索に資する有用なデータマイニング技術の構築が急務の課題である。そこで本研究では、近年急速に普及・発展し革新的技術として期待されている深層学習に着目し、そのアルゴリズムをデータマイニング技術として導入することにより、生体分子複雑系の解析へと適用可能な深層学習支援型代謝プロファイリング技術の構築を目指した。さらに、構築した代謝プロファイリング技術と従来法との比較により、魚類多様性の特徴抽出能を評価した。
【実験方法】　日本各地の沿岸および河口域等から採集した多様な魚類（83 科 230 種 2115 個体）を研究対象とし、魚類筋肉中に含まれる代謝混合物を $^{1}$H-NMR（2D *J*res NMR）により計測した。得られたスペクトルデータ（2D *J*res NMR の skyline projection）は数値化・マトリクス化し、深層学習支援型代謝プロファイリング技術の構築に供試した。
【結果】　深層学習は学習（計算）過程における内部構造の複雑さゆえに、分類や回帰モデルの生成に寄与する重要な変数（バイオマーカー候補となる代謝物質）が直接的に特定できないという大きな問題があった。本研究では、ブートストラップ法とパーミュテーション法を深層学習アルゴリズムに組み込むことによりこの問題を解決し、生成モデルに寄与する重要変数を評価可能な深層学習支援型代謝プロファイリング技術の構築に成功した。構築した本手法を用いてマハゼの地域判別能を評価した結果、同じ機械学習の手法であるランダムフォレストやサポートベクターマシンの正解率（94%程度）と比べ精度の高い（98%程度）モデルが生成され、それぞれの地域に特徴的な代謝物群の特定に成功した。また、従来法（PLS）では全く評価できなかった魚類多様性における特定魚種の特徴抽出能評価においても良好な判別精度を示し、各魚種に特徴的な代謝物群を見出すことも可能であった。以上のことから本研究では、深層学習アルゴリズムを代謝プロファイリング技術へと世界で初めて導入し、産地判別能の向上やバイオマーカーの探索に資する有用な代謝プロファイリング技術の構築に成功した。あわせて、本手法や他の機械学習法を用いた比較解析により得られた、手法選択の指針に関する最新の知見についても本会で議論したい。

NMR, data mining, metabolomics

発表責任者：伊達康博（yasuhiro.date@riken.jp）

講演番号：3J30p05
講演日時：3 月 19 日 15:00～ J 校舎 30 会場

# 二電極式多成分同時電解による電気化学バイオセンシング

# Amperometric biosensing for simultaneous multi-component detection based on the two-electrode system

勝辺 隆太郎、○北隅 優希、白井 理、加納 健司（京大院農）
Ryutaro Katsube, ○Yuki Kitazumi, Osamu Shirai, Kenji Kano (Kyoto Univ.)

【緒言】

生体物質の定量法の中でも、電気化学バイオセンサーは、簡便、迅速、安価といった特徴を持つ。その中で、アンペロメトリックバイオセンサーは酸化還元酵素反応と電極反応をメディエータと呼ばれる低分子酸化還元物質で共役させることで、基質を電解し、その際の電解電流が基質濃度に比例することを利用したセンサーである。バイオセンサーは酸化還元酵素の持つ基質特異性を利用することで、高い選択性で目的物質の濃度を決定することが可能である。だが、生体試料は主成分である水分含有量の変動が大きいために、目的成分のみの濃度決定では、濃度変化の起源を見誤る可能性がある。そこで、目的成分と同時に、濃度の恒常性が担保されている成分を定量すること、あるいは複数成分の濃度比を比較することが重要である。

電気分析化学では、電極電位を溶液電位に対して制御するため、参照電極を取り入れた三電極式での測定が一般的である。しかしながら、回路構成および電極構成が複雑となるため、電気化学センサーの利点を損なってしまう。そこで、参照電極を使わない二電極式で同時に複数成分の定量が可能なバイオセンシングを実現するためのパターン電極の作成と、それを利用した同時検出について検討を行った。

【実験】

電極のパターンを印刷したポリエステルフィルム上に金をスパッタリングで成膜し、金ごとトナーを溶剤で除去することにより、パターン電極を製作した。直径が 5 mm の対極となる電極に銀塩化銀ペーストを塗布後乾燥させた。作用電極は直径 1 mm とした。電極パターンが覆われるように試料溶液を添加した。多チャンネルのポテンショスタットを接続し、各電極と対極間の電位差を制御して電気化学測定を行った。

【結果と考察】

モデル酸化還元メディエータとしてフェロセンジメタノールを含む緩衝液を添加し、それぞれの電極を異なる電位に保持し、流れた電流の検討を行った。電極のパターンを検討したところ、作用電極の大きさを小さくし、また電極までのリード部分を太くすることで、応答が改善した。一定時間後の電流を電位に対してプロットすることで、シグモイド型のボルタモグラムを描くことができた。これは、二電極式での同時多電極測定が実現可能であることを意味する。

Amperometric biosensor, Simultaneous detection, Two-electrode system

講演番号：3J30p06
講演日時：3 月 19 日 15:25～ J 校舎 30 会場

# 海洋微生物ラビリンチュラ類における選択マーカーリサイクル法の開発

# Recycling Selectable Marker in Thraustochytrid

○石橋 洋平、伊東 信（九大院農）
○Yohei ISHIBASHI, Makoto ITO (Kyushu Univ.)

ラビリンチュラ類は高い脂質生産・蓄積能力と優れた増殖能を持ち、機能性脂質として知られる DHA(22:5n-3)などの高度不飽和脂肪酸を生産する海洋微生物である。私達は、ラビリンチュラ類の C20 エロンガーゼ遺伝子を破壊することで EPA(20:5n-3)を、Δ4 デサチュラーゼ遺伝子を破壊することで DPA(22:5n-3)を戦略的に生産する技術基盤を開発したことを報告した（合田ら、日本農芸化学会 2016 年度大会）。これらの代謝改変株は機能性脂質や飼料などの新規供給源として期待されるが、さらに脂質生産量を向上させるには代謝ボトルネックの解消のために分子育種を進める必要がある。

従来、ラビリンチュラ類に適用できる選択マーカーには限りがあり、その数を超える回数の形質転換を行うことは不可能だった。形質転換回数の制約はラビリンチュラ類の分子育種を進めて行く上で大きな障壁であり、選択マーカーリサイクル法の開発が強く求められていた。今回、私達は Cre-loxP と FLP-FRT 法を組み合わせた、ラビリンチュラ類に適用可能な実践的な選択マーカーリサイクル法を開発したので報告する。

産業利用への期待が高いオーランチオキトリウム属を用いて本法の有効性を検証した結果、ゲノムに組み込まれた選択マーカーの脱落と、それに対応する抗生物質感受性の回復が認められた。さらにこの株に対し、脱落した選択マーカーを再度導入した結果、抗生物質耐性能を再獲得した形質転換株を得ることができた。今回開発した方法はラビリンチュラ類全般に利用可能であり、この微生物を本格的に産業利用するための重要な基盤技術になることが期待される。

本研究は農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業を活用して行われた。

Thraustochytrid, Transformation, Selectable maker recycling

講演番号：3J30p07
講演日時：3 月 19 日 15:40～ J 校舎 30 会場

渦鞭毛藻の麻痺性貝毒及び生合成中間体のカラムスイッチング HILIC-HILIC-MS-MRM による分析
Column switching HILIC-HILIC-MS-MRM for the analysis of saxitoxin analogues, and their biosynthetic intermediates in dinoflagellates

○長 由扶子[1]、土屋 成輝[1]、吉岡 廉平[1]、大村 卓朗[2]、此木 敬一[1]、大島 泰克[3]、山下 まり[1]([1]東北大農、[2]LASC、[3]東北大生命)
○Yuko CHO[1], Shigeki TSUCHIYA[1], Renpei YOSHIOKA[1], Takuo OMURA[2], Keiichi KONOKI[1], Yasukatsu OSHIMA[3], Mari YAMASHITA[1] ([1]Tohoku Univ. Agri., [2]LASC, [3]Tohoku Univ. Life Sci.)

[背景・目的]麻痺性貝毒はサキシトキシンに代表される神経毒であり、国内では主に *Alexandrium* 属の渦鞭毛藻が生産する。有毒プランクトンを摂取した二枚貝に毒が蓄積し、毒化した貝を喫食したヒトに中毒を引きおこす。陸上では淡水産藍藻も麻痺性貝毒を生産することが知られており、生合成遺伝子クラスターが報告された。我々は藍藻の推定生合成遺伝子の機能から構造が推定された生合成中間体（Int-A′と Int-C′2）を化学的に合成し、それらの $^{15}N$ 標識体がラン藻において麻痺性貝毒に変換されることを報告した[1)]。渦鞭毛藻にもこれらが存在することから、初期段階はラン藻と同様な経路と予想されているが、詳細は不明である。渦鞭毛藻の麻痺性貝毒生合成経路の解明のために麻痺性貝毒と生合成中間体の定量が必要であるが、麻痺性貝毒の定量法として従来用いられている蛍光誘導体化ポストカラム HPLC 法は生合成中間体には応用できない。また LC-MS 分析法では両者を同時に回収する前処理法が確立されていない。本研究では遠心分離とろ過以外の前処理を要しない LC-MS による渦鞭毛藻粗抽出液中の麻痺性貝毒及び生合成中間体一斉分析法を開発したので報告する[2)]。
[方法]二段階グラジエントと カラムスイッチング法を導入した HILIC-HILIC-MS-MRM により分析した。濃縮カラムとして、C30, TSK-gel amide, SeQuant® ZIC ®-HILIC の 3 種のガードカラムを連結し、分析カラムとして SeQuant® ZIC ®-HILIC を用い、移動相に 10 mM ギ酸アンモニウムを含む水とアセトニトリルを用いた。標品の麻痺性貝毒 15 種とアルギニン、生合成中間体合成品 2 種(Int-A′, Int-C′2)、シャント化合物（Cyclic-C′）により、定量性を評価した。渦鞭毛藻 *A. tamarense* 有毒株を供試株として 0.5M 酢酸抽出液を 1 万 Da の限外ろ過した試料について、添加回収試験によりマトリックス効果を評価した。さらに毒性の異なる *A. catenella* 有毒株 2 種について本法を応用した。
[結果] 本法は HILIC 分析においてしばしば問題となる溶出時間の変動が小さい点が特徴である(RSD< 1%)。化合物の選択的検出、感度（標品の検出限界：0.9 μM (Int-C′2) - 116 μM (C3))、検量線の直線性、添加回収試験による回収率、再現性も良好であった。渦鞭毛藻 *A. tamarense* 有毒株の麻痺性貝毒量はポストカラム蛍光誘導体化 HPLC 法の結果ともよい一致を示した。さらに本法を毒性の異なる 2 株の *A. catenella* に応用してこれらの株中にも中間体（Int-A′, Int-C′2）及びシャント化合物（Cyclic-C′）が存在することを初めて明らかにした。

1) S. Tsuchiya, Y. Cho, K. Konoki, K. Nagasawa, Y. Oshima, M. Yotsu-Yamashita, 2016, Scientific Reports, 6, 20340.
2) Y. Cho, S. Tsuchiya, R. Yoshioka, T. Omura, K. Konoki, Y. Oshima, M. Yotsu-Yamashita, 2016, Journal of Chromatography A, 1474, pp. 109-120.

LC-MS, Saxitoxin, biosynthetic intermediates

発表責任者：長　由扶子（choyuko@m.tohoku.ac.jp）

講演番号：3J30p08
講演日時：3 月 19 日 15:55～ J 校舎 30 会場

マウス白血病ウィルス由来逆転写酵素の N-tailing 活性と解析ツール TraceViewer
Efficient N-tailing of blunt DNA ends by Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase
○大坪 嘉行、永田 裕二、津田 雅孝（東北大院生命）
○Yoshiyuki Ohtsubo, Yuji Nagata, Masataka Tsuda (Tohoku Univ.)

マウス白血病ウィルス由来の逆転写酵素(Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase; MMLV-RT)は cDNA 合成の用途などに幅広く使用されている逆転写酵素である。我々は、本酵素がこれまでにない強いターミナルヌクレオチジルトランスフェラーゼ活性を有していることを発見したので報告するとともに、解析を行うにあたって作成したソフトウエア TraceViewer(http://www.ige.tohoku.ac.jp/joho/traceviewer/)について紹介する。
これまで多くの DNA ポリメラーゼが、非鋳型依存的に DNA 平滑末端の 3’端にヌクレオチドを付加することで 3’突出を形成することが報告されてきた。これまでに報告がある DNA polymerase は単一のデオキシアデノシンモノリン酸(dAMP)をある程度高い効率で付加可能であり、Taq ポリメラーゼ、あるいは Klenow fragment (exo-)が TA クローニングや次世代シーケンサーのライブラリー調整に使われている。一方既知 DNA ポリメラーゼは dCMP、dGMP、dTMP については効率良く付加できないとされている。
我々は、MMLV-RT は A>G>T>C の順に強い付加活性を有しており、Mn2+の存在下で、4 から 5 個の A、2 から 7 個の C、2 から 4 個の G、2 から 3 個の T を付加可能であることを見出した。MMLV-RT の付加活性は十分に強く、少なくとも我々がこれまでに用いたモデル DNA を用いた付加反応では、全く塩基付加されていない末端は反応後にほとんど残らなかった。実際、平滑末端 DNA に対して塩基付加反応したのちに、相補的な突出末端を有する DNA を ligation したところ高い効率(95%以上)で連結された。さらに我々は、付加活性を促進する化合物を見出しており、MMLV-RT の高い塩基付加活性は、今後 DNA プールの悉皆的解析等多様な方面で活用されることが期待される。
TraceViewer は、ABI キャピラリーシーケンサーによる泳動結果を解析するためのソフトウエアである。サイズの測定対象である蛍光ラベルされた DNA ストランドと、別の蛍光でラベルされた様々なサイズの DNA 断片からなるサイズスタンダードを混合後、キャピラリーシーケンサーによって泳動しデータを取得する。TraceViewer は選択した任意の 2 つのサイズスタンダードによって泳動度を補正することができ、広いレンジのサイズ（20 塩基から 800 塩基程度)のフラグメントについてサイズの変化を 1 塩基の解像度で知ることができる。本ソフトウエアは、従来変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で行っていた解析を、キャピラリーシーケンサーによる解析へと転換可能なソフトウエアである。

tailing reaction, MMLV-RT, software

発表責任者：大坪嘉行（yohtsubo@ige.tohoku.ac.jp）

講演番号：3J30p09
講演日時：3 月 19 日 16:10～ J 校舎 30 会場

CRISPR-Cas9 システムを用いた大腸菌ゲノムの遺伝子多重ノックアウト
Multigene knockout on *E.coli* genome using CRISPR-Cas9 system

○三宅 裕可里[1]、石浜 明[2]、山本 兼由[1,2] ([1]法政大学生命科学部、[2]法政大・マイクロナノテクノロジーセンター)
○ Yukari MIYAKE[1], Akira ISHIHAMA[2], Kaneyoshi YAMAMOTO[1,2] ([1]Hosei University, Department of Frontier Bioscience, [2]Hosei University, Research Center for Micro-Nano Technology)

細菌は外環境の変化に対し、細胞内で情報伝達を行い適切な遺伝子の発現を調節することにより適応する。細菌の主要な情報伝達機構として知られている二成分制御系はセンサーキナーゼとレスポンスレギュレーターから構成されており、大腸菌 K-12 株では約 30 組の二成分制御系が存在する。センサーキナーゼとレスポンスレギュレーターの情報伝達は特異的なリン酸基の転移により行われるが、これらに加え交差した情報伝達（クロストーク）が報告されている。細菌がもつ環境適応能を理解するためには、包括的なゲノム機能として解析する必要がある。本研究では CRISPR-Cas9 システムを用い大腸菌ゲノムの多重遺伝子の機能欠失をすることを目指した。

はじめに大腸菌 K-12 株を対象に、CRISPR-Cas9 システムを用いた既存のゲノム編集法を改変した遺伝子多重欠失法を設計した。設計した系では、Cas9 とゲノム上の標的遺伝子特異的なガイド RNA によるゲノム切断後、組換え酵素によって標的遺伝子に改変 DNA を導入させる。そこで、Cas9 依存的にゲノム切断するガイド RNA クローニングシステムの構築を行った。ガイド RNA を簡便にクローニングできるベクターを構築し、PAM 配列からゲノム上の標的遺伝子に相補する複数のガイド RNA 候補配列のクローンを得た。これらのガイド RNA の機能性を調べるため、Cas9 発現大腸菌への導入による致死性で評価した結果、いくつかのガイド RNA でゲノム切断機能を示すものを確認した。このようなガイド RNA クローンを用い、抗生物質耐性遺伝子カセットや人工配列の線状 DNA の細胞内導入による組換え反応で、ゲノム上の標的遺伝子の機能欠失を試みた。抗生物質耐性遺伝子カセットの導入により獲得した標的遺伝子欠失株については、3 種類の抗生物質耐性遺伝子を用いた多重欠失をできるようにデザインし、またゲノム上に導入したカセットは FLP 組換え酵素により除去するシステムとした。得られた標的二成分制御系遺伝子欠失株について、ルシフェラーゼレポーターアッセイにより評価を行った。これらの結果より、設計した CRISPR-Cas9 システムによる大腸菌ゲノム編集によって、抗生物質耐性遺伝子カセットや人工配列線状 DNA の細胞内導入による大腸菌 K-12 株ゲノム上の遺伝子機能を欠失することを確認した。さらに、複数の抗生物質耐性遺伝子カセットを用いた CRISPR-Cas9 システムで、大腸菌ゲノム上の *narXL* 遺伝子と *narP* 遺伝子の二重欠失株を単離することに成功した。

E.coli, CRISPR-Cas9, multigene knockout

発表責任者：山本兼由（kanyamam@hosei.ac.jp）

講演番号：3J30p10
講演日時：3 月 19 日 16:25～ J 校舎 30 会場

# 高速 DNA シークエンシングを用いたカブトムシ由来転写因子 Dsx 結合部位ゲノムワイド解析

# Genome-wide analysis of DNA binding sites for a *Trypoxylus dichotomus* transcription factor, Dsx, by high-throughput DNA sequencing

○岡 大椰[1]、兒島 孝明[1]、梶川 友也[1]、後藤 寛貴[2]、新美 輝幸[3]、井原 邦夫[4]、中野 秀雄[1]([1]名大院・生命農・生命技術、[2]名大院・生命農・生物機構、[3]基生研、[4]名大・遺伝子実験施設)
○Hiroya Oka[1], Takaaki Kojima[1], Tomoya Kajikawa[1], Hiroki Gotoh[2], Teruyuki Niimi[3], Kunio Ihara[4], Hideo Nakano[1] ([1]Dept. Bioeng., Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ., [2]Dept. Biol. Mech. Funct., Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ., [3]NIBB, [4]Centre for Gene Research, Nagoya Univ.)

【目的】 転写因子の一種である DNA 結合型転写因子は、制御遺伝子上流に配列特異的に結合し、その発現制御を行うタンパク質群の総称であり、細胞の発生や分化など様々な機能、現象がこれら転写因子によって制御されている。カブトムシ由来の DNA 結合型転写因子である *doublesex* (*dsx*) は、性決定遺伝子の一つであり、これまでの研究から角形成において極めて重要な役割を果たし、様々な角形成遺伝子の発現を直接的に制御する転写因子である可能性が示唆されている。

本研究グループは、高速 DNA シークエンシング技術を駆使した２種類の転写因子制御部位の網羅的解析技術、Genomic SELEX-Seq (gSELEX-Seq)と RNA-Seq を融合させた転写制御ネットワークの新規網羅的開発システムの開発に成功している。gSELEX-Seq はゲノムライブラリーから標的転写因子に対して結合性を有する領域を *in vitro* で濃縮選択した配列情報を、RNA-Seq は標的細胞より回収した mRNA ライブラリーから各遺伝子の発現量情報をそれぞれ出力する。

本研究では、この技術を用いることにより、カブトムシの性決定遺伝子 Dsx の結合配列の特定及び Dsx に制御されるカブトムシ角形成に関与する遺伝子の網羅的特定・解析を目的とした。

【方法・結果】 平均約 300～400 bp に剪断化したカブトムシゲノムライブラリーを作製し、このライブラリーに対してメス型 Dsx とポリヒスチジンタグとの融合タンパク質(Dsx-F-His)を添加した。これにより Dsx 結合部位を有する DNA と Dsx-F-His タグとの複合体が形成され、この複合体を Ni-NTA アガロースにより分離した後、選択された DNA を PCR によって回収した。この操作を 3 ラウンド実施後、各選択ラウンド DNA プールをマイクロビーズ上に固定し、Dsx-F-His 及び蛍光標識抗体を用いて Dsx-F-His の結合アッセイ及び免疫染色を施した。調製したビーズ複合体をフローサイトメトリー解析に供したところ、ラウンドを重ねるごとに結合シグナルの増加を確認した。そこで、各ラウンド DNA プールを高速シーケンシング解析に供し、得られた配列データに対してバイオインフォマティクス解析を行ったところ、ラウンド 3 より選択された DNA プールより ACAATGT の結合配列が抽出された。この配列モチーフはショウジョウバエ由来の Dsx における既知の結合モチーフ”GCAACAATGTTGC”と類似していた。

今後、本結果より得られた結合領域下流に位置する遺伝子の特定を行うとともに、RNA-Seq を用いて転写因子依存的発現変動遺伝子(DEGs)を検出し、これらの積集合をとることにより Dsx によって直接的に発現制御される遺伝子の同定を試みる。

Transcription factor, Trypoxylus dichotomus, High-throughput sequencing

発表責任者：中野秀雄（hnakano@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3J30p11
講演日時：3 月 19 日 16:50～ J 校舎 30 会場

# Fc レセプターを用いたアフィニティ分離剤による抗体医薬品の分離

# Separation of antibody drugs by affinity resin coupling engineered Fc receptor

○遠藤 諭、寺尾 陽介、山中 直紀、青木 大、西山 しずか、大江 正剛（東ソー）
○Satoshi Endo, Yosuke Terao, Naoki Yamanaka, Masaru Aoki, Shizuka Nishiyama, Seigo Oe (Tosoh Corp.)

【背景と目的】がんや炎症、自己免疫疾患などの治療薬として近年さまざまな抗体医薬品が開発され、その市場が大きく拡大している。しかしながら、巨大分子である抗体を高品質かつ安定的に製造することは今日においても容易ではない。特に、抗体の Fc 領域に結合する N 型糖鎖は多様性に富み、その糖鎖構造の違いにより免疫細胞上の Fc レセプター（FcR）との結合性が変化し、医薬品の薬効に影響することが数多く報告されている。そのため、抗体医薬品は適切な方法で品質を維持し、同一性を担保することが求められる。そこで当社では、抗体を糖鎖構造の違いにより分離可能な技術の提供を目指し、FcR をリガンドとしたアフィニティ分離剤を開発してきた[1]。この技術により糖鎖構造のバラつきを抑えた、安定かつ高品質な医薬品製造を実現できる。
【方法と結果】これまで、進化工学法により FcR のアミノ酸配列を改変し、安定性が高い FcR を開発してきた[2]。高安定化 FcR を大腸菌により発現し、分離剤用ゲル（担体）に固定した FcR 固定化分離剤を調製した。FcR 固定化分離剤を用いたクロマトグラフィーにより、モノクローナル抗体は保持時間が異なる複数のピークに分離されることが明らかとなった。これらのピークを分取し、抗体の糖鎖構造解析を行った結果、保持時間の違いにより糖鎖構造分布が異なることを見出した。
本発表では、本分離剤に適した抗体精製分離方法として、緩衝液の pH と塩濃度、流速を最適化した分析法を構築し、ピークの分離度向上に成功したことを報告する。これらの結果から、開発したアフィニティ分離剤を用いることで、糖鎖構造の異なる抗体をより高純度に分離可能となり、高品質な医薬品製造への応用が期待できる。

[1]田中ら： 第 67 回日本生物工学会大会, 2P-234（2015）
[2]朝岡, 田中ら： WO2015/041303, WO2015/199154

affinity resin, Fc receptor, antibody

発表責任者：遠藤 諭（satoshi-endou-sq@tosoh.co.jp）

講演番号：3J30p12
講演日時：3 月 19 日 17:05～ J 校舎 30 会場

# cDNA display using *E. coli*-based translational system

○JiCheng Fan[1], Jasmina Damnjanovic[1], Takaaki Kojima[1], Naoto Nemoto[2], Hideo Nakano[1]
([1]Nagoya Univ., [2]Saitama Univ.)

cDNA display is an *in vitro* display technology evolved from mRNA display in the late 1990s. It has been often used for directed evolution of proteins since it enables in high-throughput screening of random libraries of up to $10^{14}$ different sequences. cDNA display relies on covalent binding between mRNA and a corresponding protein via puromycin, followed by conversion of mRNA into a more stable cDNA.

cDNA display developed by Nemoto Lab relies on robust and time-cost efficient steps enabling variety of selections to be successfully performed. Furthermore, specially designed puromycin linker enables stable linkage between mRNA, protein and cDNA, simplifies manipulation and detection and provides optimal spatial orientation of the three display components. Currently, the cDNA display is based on *in vitro* translation using eukaryotic cell extracts to synthesize proteins. To expand the utility of this display system, we aimed to investigate possible application of *E. coli* extracts in the translation step, as the one potentially advantageous for proteins containing disulphide bonds or other structural complexities.

In this study, going through the steps of *in vitro* transcription, ligation of mRNA to the linker, *in vitro* translation and reverse transcription, we have shown that *E. coli* extracts can be used for the *in vitro* translation step. After constructing the suitable DNA templates, we evaluated the performance of cDNA display using Rabbit reticulocyte lysate and PURE system in the selection of B domain of protein A (BDA) from the equimolar mixture of BDA and POU-specific DNA-binding domain of Oct-1 (PDO) displays and demonstrated high efficiency of the PURE system. Generated protein-mRNA-cDNA complexes were clearly observed by the SDS-PAGE, in the amounts sufficient to allow for successful selection of BDA from the display pool. Remarkably, after attaching a short N-terminal peptide tag and shortening the incubation time for the reaction using PURE system, we observed increase in the amount of generated protein-mRNA-cDNA complexes.

cDNA display, Directed evolution, *in vitro* protein synthesis

講演番号：3J30p13
講演日時：3 月 19 日 17:20～ J 校舎 30 会場

# 分岐鎖アミノ酸に対する FRET 型蛍光バイオセンサーの開発

# Development of FRET-based Biosensor for Branched-Chaine Amino Acids

○高橋 世菜、垣塚 彰、今村 博臣（京大生命）
○Sena TAKAHASHI, Akira KAKIZUKA, Hiromi IMAMURA (Kyoto Univ.)

バリン、ロイシン、イソロイシンは分子内の側鎖に分岐構造をもつため分岐鎖アミノ酸（Branched-Chine Amino Acids, BCAA）と総称される。細胞内の BCAA 濃度は mTOR 経路などを通じて細胞の代謝に重要な影響を及ぼすと考えられており、例えば、BCAA の摂取により運動中の筋タンパク質の分解を抑制することや、BCAA を制限した食事は体重を減少させる効果があることなどが報告されている。また、サプリメントや一部のスポーツ飲料にも使用されるなど、社会的にも注目されている。しかしながら、細胞や生体内の BCAA 濃度を測定する方法は確立されておらず、その動態は必ずしも明確ではない。そこで本研究では、蛍光バイオセンサーを用いて生細胞内のイメージングをおこない、BCAA 濃度を顕微鏡で可視化し、BCAA 分布やその変動を計測する手法を確立することを目的として研究をおこなった。

まず、大腸菌由来の分岐鎖アミノ酸結合タンパク質(LIVBP)の立体構造情報(Sack *et al.* 1989 *J Mol Biol* 206, p193)に基づき、LIVBP の途中にフェルスター共鳴エネルギー移動(FRET)を生じる２種類の蛍光タンパク質 CFP と YFP を挿入させた人工融合タンパク質の遺伝子を合成した。BCAA 濃度が低い条件下では、CFP と YFP の距離が長いため FRET 効率は低くなる一方で、濃度が高い条件下では、LIVBP が構造変化を起こし CFP と YFP の距離は縮まり、FRET 効率は高くなると予想された。

次に、この BCAA バイオセンサーを培養哺乳類細胞内で発現させイメージングをおこなった。作製した BCAA バイオセンサーが細胞内環境で機能するかを確かめるため、細胞環境中をアミノ酸飢餓状態にし、この状態で BCAA を加えた際に FRET 効率の変化が見られるかをタイムラプス計測により確認した。その結果、アミノ酸飢餓状態から BCAA を加えた際に大きな FRET 効率の上昇が観察された。この事から、作製した BCAA バイオセンサーによって、生細胞内の BCAA 濃度を顕微鏡で可視化できることが強く示唆された。現在、さらに詳細な性質の解析を進めている。また、ここで採用する研究アプローチが成功すれば、今後は同様の方法で残りのアミノ酸に対する蛍光バイオセンサーも作製することが可能であると考える。

biosensor, BCAA, FRET

講演番号：3J30p14
講演日時：3 月 19 日 17:35～ J 校舎 30 会場

# 微小培養環境システムを用いたバイオフィルム解析チップの開発

# Development of the chip for analysis of biofilm by a micro culture system

○伏木 蒼太郎[1]、茂木 亮介[2]、佐々 文洋[3]、野村 暢彦[2]、鈴木 博章[1]、横川 雅俊[1] ([1]筑波大院数理物質、[2]筑波大院生命環境、[3]九州大院システム情報)
○ Sotaro FUSHIKI[1], Ryosuke MOGI[2], Humihiro SASSA[3], Nobuhiko NOMURA[2], Hiroaki SUZUKI[1], Masatoshi YOKOKAWA[1] ([1]Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba, [2]Graduate School of Life and Environment Sciences, University of Tsukuba, [3]Graduate School of Information Science and Electrical Engineering, University of Kyushu)

【背景・目的】　従来、単細胞生物である微生物は単独で生息していると考えられてきたが、環境中においては集団（バイオフィルム）を形成し、その内部において相互作用することによって高度に環境適応している。また、機能的に分化し時に多細胞的な振る舞いをすることも明らかにされつつある。しかし、バイオフィルムは空間的な広がりを持ち、また内部での微生物活動は複雑なため、その解析は従来の分析技術では容易ではない。そこで、本研究では、バイオフィルム内部での微生物の振る舞い及びその不均一性をモニタリングすることを目的に、微生物をプローブとしたバイオフィルム解析チップの開発を試みた。
【方法・結果】　本研究では、細胞増殖に必要な栄養や増殖因子などの物質が透過可能なマイクロゲルビーズ内に微生物を包埋し、これを微小なチャンバ内に充填する。この独立した培養環境内での微生物増殖活性を指標とした環境応答センサを作製し、これをアレイ化することでバイオフィルム解析チップとした。マイクロゲルビーズはアルギン酸を用いて作製した。アルギン酸はカルシウムイオンによって架橋され、急速にゲル化する。この反応を利用し、市販の注射針（35 G、内径 100 μm）を用いたデバイスに菌液及び培地を含んだアルギン酸溶液を導入し、遠心により、大きさの揃ったゲルビーズを作製した。このゲルビーズ 1 つに対して微生物が数個内包されるように、導入する菌体濃度を調製した。作製した菌内包ゲルビーズは、微小なチャンバをアレイ状に配置したチップ内のチャンバに 1 つずつ収容し、これをセンサチップとした。アルギン酸ゲルは、ゲル構造が緻密で強固であるため菌の増殖が阻害される。そこで、Layer-by-layer 法を用いて多層シェル構造を備えたゲルビーズを作製し、その内部のアルギン酸ゲルのみをアルギン酸分解酵素によって可溶化した。このゲルビーズ内に封入された蛍光分子（フルオロセイン）は、時間経過に伴いビーズ外へと拡散し、内部の蛍光強度が減少することから、シェル構造の物質透過性が確認された。さらに可溶化されたゲルビーズ内部に大腸菌を内包し、チャンバーアレイを用いてゲルビーズを分離し 37℃で 24 時間培養を行った。ゲルビーズ内部では大腸菌が増殖し、菌の培養が可能であることが確認された。以上の結果から、微生物がゲルビーズ内部の微小空間において、環境因子に応答して個別培養されるセンサチップが実現され、このチップ上にバイオフィルムを形成することで、その内部の微生物の活性を測定することが可能となる。

biofilm, alginate gel, micro culture chip

発表責任者：伏木蒼太郎（s-fushiki@ims.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3J31a01
講演日時：3 月 19 日 09:20～ J 校舎 31 会場

水生植物 Egeria 属と Elodea 属における異型細胞形成の再評価
Evaluation of the idioblast development in Egeria and Elodea species
○大谷 友佑[1]、植竹 祥子[1]、篠塚 舞[1]、金澤 美加子[1]、伊藤 竜一[2]、藤原 誠[1] ([1]上智大理工、[2]琉球大理)
○Yusuke OTANI[1], Syoko UETAKE[1], Mai SHINODUKA[1], Mikako KANAZAWA[1], Ryuuichi ITOH[2], Makoto FUJIWARA[1] ([1]Sophia Univ., [2]Univ. of the Ryukyus)

【目的】トチカガミ科の *Egeria* 属と *Elodea* 属の水生植物は、シュート形態が互いに似ており、しばしば種の判定が困難である。現在の分類学上、*Egeria* 属の葉には無色透明の異型細胞が存在し、*Elodea* 属の葉には繊維と褐色の異型細胞が形成されると定義されている[1]。日本では半世紀以上前から、オオカナダモ(*Egeria densa*)、コカナダモ（*Elodea nuttallii*）が帰化し、侵略的外来種として分布域を拡大している。以上の背景の下、本研究では *Egeria* 属のオオカナダモとエゲリア・ナヤス（*Egeria najas*）、*Elodea* 属のコカナダモの葉の形態学的特徴を蛍光顕微鏡観察により再検証した。
【結果と考察】三種の植物を観察したところ、鋸歯については既報の通りであった。一方、異型細胞に関しては既報と異なる結果が得られた。(1)オオカナダモには無色透明の異型細胞が存在し、UV 照射により青白い蛍光を生じたが、エゲリア・ナヤスには異型細胞が検出されず、UV で青白い自家蛍光を生じる細胞も存在しなかった。(2)コカナダモには褐色の異型細胞が存在したが、異型細胞分化が葉の発生においてプログラムされているオオカナダモとは異なり、異型細胞が存在しない健常葉が頻繁に見つかった。(3)成長不良時のコカナダモの葉には、褐色細胞が高頻度に存在した。(4)成長不良時のオオカナダモ、エゲリア・ナヤスにおいても褐色の細胞が確認された。なお、どの植物の褐色細胞でも、UV 照射で特異的な自家蛍光は生じなかった。

これらの結果から、*Egeria* 属の異型細胞形成については種の特異性が修正されると共に、従来定義されてきた *Elodea* 属の「異型細胞」は、通常の表皮細胞の壊死と関連したものであることが示唆された。

【参考文献】
[1]Cook, C.D.K. and Urmi-König, K. Aquat. Bot. 19, 73-96 (1984); Cook, C.D.K. and Urmi-König, K. Aquat. Bot. 21,111-156 (1985)

idioblast, aquatic plant, Egeria

発表責任者：藤原誠（mtf1@mac.com）

講演番号：3J31a02
講演日時：3 月 19 日 09:35～ J 校舎 31 会場

水生植物オオカナダモの異型細胞分化とその役割
Development and function of idioblasts in Egeria densa Planch.
○藤井 春希[1]、大谷 友佑[1]、金澤 美加子[1]、篠塚 舞[1]、小林 永実[1]、伊藤 竜一[2]、藤原 誠[1]([1]上智大理工、[2]琉球大理)
○ Haruki FUJII[1], Yusuke OTANI[1], Mikako KANAZAWA[1], Mai SHINODUKA[1], Emi KOBAYASHI[1], Ryuuichi ITOH[2], Makoto FUJIWARA[1] ([1]Sophia Univ., [2]Univ. of the Ryukyus)

【背景】オオカナダモ（学名：*Egeria densa*）は、単子葉植物に属する多年草の沈水植物である。オオカナダモの葉は、中肋を除いて大部分が 2 層の表皮から成り立ち、細胞観察が容易なことから学生実験の材料として広く用いられている。オオカナダモの葉や茎の表皮には、葉緑体を含まない無色透明の異型細胞が存在する。近年、当研究室において、オオカナダモの葉に紫外線を照射すると異型細胞から青白い蛍光が生じることが観察された。これは Perner による 1950 年の観察の再発見であり、以来、当研究室ではこの蛍光を指標として異型細胞のパターン形成と内容物に関する解析を行ってきた（Hara et al., 2015）。これまでに、オオカナダモの異型細胞が葉の背腹軸、前後軸、左右軸に依存した空間分布を示すことや、異型細胞が時折葉の伸長方向に連続（クラスター化）して存在すること、さらに紫外線照射によって蛍光を発する物質が異型細胞の液胞に含まれていることが示唆されている（小林ら、本大会 2015 年度発表）。一方、オオカナダモ異型細胞の内容物に関しては、1950-1960 年代に染色実験によりタンニンまたはリン脂質が含まれることが示唆されているものの、決定的な結果は未だ得られていない。そこで本研究では、細胞染色法により異型細胞の液胞主要成分を検知することを目指した。さらに、成熟葉における異型細胞パターンについても、さらなる知見を得るために解析を行った。
【結果】脂質、糖類（デンプン、リグニン）などの存在を検出するため、計 9 種類の染色試薬を選び、オオカナダモの成熟葉を染色した。その結果、酸性脂質を検出する Nile Blue A 染色で陽性反応が見られた。一方、中性脂質を検出する Sudan III 染色では陽性反応が見られなかった。その他の染色試薬でも陽性反応が見られなかったため、オオカナダモの異型細胞は酸性脂質の合成と蓄積に特化したオイルセルであることが示唆された。一方、葉面における異型細胞パターンについては、前回の報告から新たな知見を得ることができた。1 つは、葉中肋部の表皮における異型細胞形成に関するものであり、もう 1 つは葉縁部における異型細胞形成に関するものである。さらに現在は、異型細胞のクラスター形成と細胞分裂との関係を検証しており、本発表ではこれらのデータも併せて報告する予定である。
文献）Hara et al. (2015) PLOS ONE 10(3): e0118965.

idioblast, aquatic plant, Egeria

発表責任者：藤原 誠（mtf1@mac.com）

講演番号：3J31a03
講演日時：3 月 19 日 09:50～ J 校舎 31 会場

緑藻クレブソルミディウムの生長とオイルボディ形成過程
Processes of growth and oil body formation in Klebsormidium
○福本 悠[1]、湖城 恵[1]、三坂 瑠奈[1]、立石 真希[2]、箸本 春樹[2]、伊藤 竜一[3]、藤原 誠[1] ([1]上智大理工、[2]神奈川大理、[3]琉球大理)
○Yu FUKUMOTO[1], Kei KOJO[1], Runa MISAKA[1], Maki TATEISHI[2], Haruki HASHIMOTO[2], Ryuuichi ITOH[3], Makoto FUJIWARA[1] ([1]Sophia Univ., [2]Kanagawa Univ., [3]Univ of the Ryukyus)

【目的】クレブソルミディウム(学名:*Klebsormidium flaccidum*)は進化的に陸上植物に近縁であり、緑藻類の中でも陸上生活に適応が進んだ微細藻類の一種である。クレブソルミディウムは一細胞列からなる糸状藻であり、一細胞当たり 1 個の葉緑体を持つ。光と栄養が十分な条件下では活発な細胞増殖により糸状体を形成する。栄養枯渇条件下では葉緑体の縮小、オイルボディの形成および糸状体の断片化が観察される。本研究では、緑藻類において標準的な培地の 1 つである MES-volvox 培地でクレブソルミディウムの藻体を培養し、栄養成長期から枯渇期にかけて細胞形態を観察した。また近年、クレブソルミディウム核ゲノムの全塩基配列が解読され、オーキシン合成関連遺伝子の存在が明らかになった。これを踏まえ、IAA を添加した MES-volvox 培地で藻体を培養し、オーキシンが藻体の生長に与える影響についても検証を行った。
【結果】栄養枯渇期の断片化した藻体を回収し、その細胞懸濁液を一定量寒天培地プレートに播種することにより、安定した培養結果が得られるようになった。蛍光顕微鏡観察の結果、培養後 1 週目では細胞内のオイルボディの縮小、葉緑体の発達および藻体の伸長が観察された。培養後 2 週目からはオイルボディの発達が始まり、葉緑体の縮小および糸状体の断片化といった栄養枯渇期に特徴的な細胞形態が観察された。3 週目からは培地プレート上のコロニーレベルでの褪色も確認された。透過型電子顕微鏡により観察を行ったところ、培養後 1 週間の藻体ではオイルボディの蓄積は認められなかったが､培養後 1 ヶ月の藻体では細胞断面積の 6 割以上をオイルボディが占めることが観察された。また、IAA 添加培地における培養を行ったところ、クレブソルミディウム細胞は高濃度の IAA により生育阻害を受けることが観察された。一方、培養 2 ヶ月目以降の藻体を用いた蛍光顕微鏡観察において、一部のオイルボディと葉緑体クロロフィル自家蛍光が共局在することが分かった。このことはオイルボディの発達過程で、クロロフィルがオイルボディへ転移する可能性を示唆するものと考えられた。現在、共焦点レーザー顕微鏡を用いてこの共局在性を精査している。

*Klebsormidium flaccidum*, oil body, auxin

発表責任者：藤原誠（mtf1@mac.com）

講演番号：3J31a04
講演日時：3 月 19 日 10:05～ J 校舎 31 会場

シロイヌナズナ葉緑体分裂異常変異体を用いた花粉発生過程における色素体増殖の解析
Profiling of plastid multiplication during pollen development in chloroplast division mutants of *Arabidopsis thaliana*

○石川 浩樹[1]、佐々木 駿[1]、平野 智也[2,3]、風間 裕介[2]、阿部 知子[2]、伊藤 竜一[4]、藤原 誠[1,2] ([1]上智大・理工、[2]理研・仁科センター、[3]宮崎大・農、[4]琉球大・理)
○Hiroki ISHIKAWA[1], Syun SASAKI[1], Tomonari HIRANO[2,3], Yusuke KAZAMA[2], Tomoko ABE[2], Ryuuichi ITOH[4], Makoto FUJIWARA[1,2] ([1]Sophia Univ., [2]RIKEN., [3]Univ. of Miyazaki, [4]Univ. of the Ryukyus)

【目的】葉緑体は均等二分裂により増殖し、その分子機構については葉緑体分裂異常変異体（*accumulation and replication of chloroplasts*；*arc*）を用いた解析などにより詳細が明らかになっている。葉緑体では、シアノバクテリア由来の FtsZ リングと細胞内共生後に獲得したダイナミンリングが協調することで二重包膜の分裂が引き起こされる。FtsZ タンパク質を完全に欠損した *ftsZ* では、葉緑体分裂が阻害されるため一細胞に１つの巨大葉緑体が形成される。同様の表現型は FtsZ リングを葉緑体内包膜にアンカーする ARC6 の変異体でも見られる。ARC6 のパラログである PARC6 の変異体では、分裂位置異常により大小様々な葉緑体が形成される。葉緑体では分裂制御機構の詳細が判明している一方、非光合成色素体についての研究は殆ど進められていない。本研究室ではこれまで、非光合成色素体の一つとしてシロイヌナズナの花粉色素体に着目し、*ftsZ* および *arc* での解析を行ってきた。*arc6* の成熟花粉粒では色素体は野生型と比較して大きな変化がなかった一方、*ftsZ* および *parc6* においては色素体が凝集するという新規の表現型が本研究室の先行研究により明らかにされた（Sasaki et al., unpublished）。今回、本研究では *ftsZ* および *parc6* の花粉発生過程における色素体の観察を行い、成熟花粉粒における色素体凝集構造の形成過程の解明を試みたので報告する。
【方法】花粉発生過程で強い活性を示す *ACTIN1* プロモーター制御下で色素体移行配列融合型 GFP を発現するシロイヌナズナ野生型、および葉緑体分裂異常変異体（*ftsZ*、*parc6*）の形質転換体系統（Columbia background）を作出した。蛍光顕微鏡下青色光励起で花粉発生過程における花粉色素体を観察し、数と形態の解析を行った。花粉発生過程については細胞の形状などを基に、初期花粉母細胞・花粉母細胞・花粉四分子・初期花粉小胞子・花粉小胞子・初期二細胞性花粉粒・二細胞性花粉粒・成熟花粉粒の８段階に分類した。
【結果】*ftsZ*、*parc6* ともに花粉発生過程を通じて色素体数の平均値は野生型と比べ減少し、一方で数のばらつきは野生型よりも大きくなっていた。さらに初期花粉母細胞から花粉小胞子にかけて、大小様々な大きさの色素体が見られ、*ftsZ*、*parc6* ではこの間色素体の分裂位置異常が起こっている可能性が示された。また花粉体細胞分裂 I 直後の初期二細胞性花粉粒において、色素体の伸長や凝集、ストロミュールの発達といった劇的な形態変化が起こり、この状況は二細胞性花粉粒から成熟花粉粒にいたるまで引き続き観察された。このことから *ftsZ* および *parc6* の成熟花粉粒における色素体の凝集構造は、配偶子形成時の色素体の劇的な形態変化が基となっていることが明らかになった。

*Arabidopsis thaliana*, Plastid, Pollen

発表責任者：藤原誠（mtf1@mac.com）

講演番号：3J31a05
講演日時：3 月 19 日 10:20～ J 校舎 31 会場

出芽酵母の多重遺伝子発現系を利用した紅藻スサビノリ由来脂肪酸鎖長伸長酵素遺伝子の機能解析
Functional analysis of fatty acid elongase genes from red algae *Porphyra yezoensis* using multigene expression system of *Saccharomyces cerevisiae*

○渡部 智弘[1,2]、長島 生[2]、菅野 陽平[3]、佐原 健彦[2]、扇谷 悟[2]、三上 浩司[4]、森田 直樹[1,2] ([1]北大院農・基礎環境微生物学、[2]産総研・生物プロセス、[3]道衛研、[4]北大院水産科学・育種生 物学)
○Tomohiro WATANABE[1,2], Izuru NAGASHIMA[2], Yohei SUGANO[3], Takehiko SAHARA[2], Satoru OHGIYA[2], Koji MIKAMI[4], Naoki MORITA[1,2] ([1]Grad. Sch. Agr., Hokkaido Univ., [2]BPRI, AIST, [3]Hokkaido Inst. Pub. Health, [4]Fac. Fish. Sci., Hokkaido Univ.)

【緒言】我々は、ドコサヘキサエン酸（DHA）やエイコサペンタエン酸(EPA)等の生理活性を示す機能性脂質を微生物で生産するための基盤技術の開発を進めている。出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）を発現宿主として用い、海藻スサビノリ（*Porphyra yezoensis*）由来の脂肪酸合成関連遺伝子の解析を進め、これまでに海藻スサビノリ由来のΔ9、Δ6、Δ12、ω3 各脂肪酸不飽和化酵素遺伝子の同定に成功している。本研究では、海藻スサビノリ由来の脂肪酸不飽和化酵素遺伝子を発現した出芽酵母を発現宿主として、海藻スサビノリ由来の脂肪酸鎖長伸長酵素候補遺伝子を発現させ、脂肪酸組成の変動を調べることで各候補遺伝子の機能解析を行った。
【方法】海藻スサビノリ由来Δ9、Δ6、Δ12、ω3、各脂肪酸不飽和化酵素遺伝子(*PyΔ9*、*PyΔ6*、*PyΔ12*、*Pyω3*)及び脂肪酸鎖長伸長酵素遺伝子ホモログ(*PyElo2*、*PyElo3*、*PyElo4*、*PyElo5*)を、自己切断ペプチドをコードした TaV 配列を介して複数連結した多重遺伝子発現プラスミドを作成した。各発現プラスミドでΔ9 脂肪酸不飽和化酵素（OLE1）遺伝子欠失酵母変異株 ole1Δ株を形質転換し、得られた形質転換体の脂肪酸組成を GC あるいは GC/MS で分析した。
【結果・考察】pLTex/PyΔ9-TaV-PyΔ6-TaV-PyΔ12 に *PyElo2* を連結したプラスミドを導入した形質転換体からは C20 の脂肪酸は得られなかった。また、*PyElo3* を連結したプラスミドを導入した形質転換体からは C20 のトリエン酸は得られなかったが、モノエン酸とジエン酸が僅かに得られ、*PyElo5* を連結したプラスミドを導入した形質転換体からは C20 のジエン酸とトリエン酸は得られず、モノエン酸のみが得られた。一方、*PyElo4* を連結したプラスミドを導入した形質転換体からは C20 のモノエン酸は得られず、僅かなジエン酸と主にトリエン酸が得られた。以上の結果より、PyElo2 は 18:1、18:2、18:3 を基質にしないこと、PyElo3 は 18:1、18:2 を基質にするも、その活性は著しく低いこと、PyElo4 は主に 18:3 を鎖長伸長すること、PyElo5 は 18:1 を鎖長伸長することがわかった。出芽酵母内でΔ6 脂肪酸不飽和化酵素を使用して EPA を合成するには、18:3(6,9,12)を 20:3(8,11,14)へ鎖長伸長させる経路が必須である。よって本研究で扱った 4 つの脂肪酸鎖長伸長酵素の中では PyElo4 が EPA の合成に有用であることが示唆された。

fatty acid elongase, red algae *Porphyra yezoensis*, *Saccharomyces cerevisiae*

講演番号：3J31a06
講演日時：3 月 19 日 10:45～ J 校舎 31 会場

# Analysis of arsenate reductase gene expression in Pteris vittata

○SHUJUN WEI[1], MEI-FANG CHIEN[1], KAZUKI SUGAWARA[2], CHIHIRO INOUE[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Seikei Univ.)

Arsenic is one of the most dangerous chemicals and is harmful to plants, animals and humans. However, some plants such as *Pteris vittata*, the most studied arsenic hyperaccumulator, show arsenic resistance and can accumulate arsenic from polluted soil or water into the fronds to concentration as high as 22,630 mg/kg. Previous studies show that *P. vittata* absorbed arsenic as arsenate and accumulated as arsenite, which indicate that there should be an arsenate reducing system in *P. vittata*. The arsenate reductase gene, *PvACR2*, has been isolated from gametophyte of *P. vittata*. However, even the sporophyte is much more active than the gametophyte, there is no report about *PvACR2* in its sporophyte. Besides, the details of *PvACR2* expression in *P. vittata* are remained unknown. The present study aimed to investigate the existence of *PvACR2* and where and when does *PvACR2* express in sporophyte of *P. vittata*. The genomic DNA of *P. vittata* was extracted, and the arsenate reductase gene was detected by a new designed primer set targeted to *PvACR2* of *P. vittata*. For gene expression, *P. vittata* under hydroponic cultivating for 8 weeks was used, and arsenate was spiked with 500 ppb when needed. Each part (root tip, root, rhizome, stipe, pinna) of *P. vittata* was collected after spiking for 0 to 24 hours. The arsenic concentration and speciation in each part was examined by LC-ICP-MS. Total RNA of each part was extracted, and the gene expression was determined by RT-PCR. The results of PCR and subsequent sequencing confirmed the existence of *PvACR2* in sporophyte of *P. vittata*. The results of LC-ICP-MS showed that the major state of arsenic in fronds was arsenite. The investigation of RNA transcript was undergoing and the comprehensive evaluation of gene expression will be further discussed at presentation.

Pteris vittata, arsenic hyperaccumulator, arsenate reductase gene

講演番号：3J31a07
講演日時：3 月 19 日 11:00～ J 校舎 31 会場

新規バイオマス測定系の確立によるシロイヌナズナ種内雑種で見られる雑種強勢現象の解析
Improved analysis of heterosis for biomass production and related traits in Arabidopsis
○杉 直也[1]、草野 都[1]、斉藤 和季[2]、柴 博史[1] ([1]筑波大・院生命環境、[2]千葉大・薬)
○Naoya SUGI[1], Miyako KUSANO[1], Kazuki SAITO[2], Hiroshi SHIBA[1] ([1]Univ. of Tsukuba, [2]Chiba Univ.)

【背景・目的】雑種強勢は、異なる種内あるいは種間の交配で得られた $F_1$ 雑種の生活力がその両親と比較して旺盛となる現象を指す。当該現象は農業分野において生産性の増加に大きく貢献している重要な現象であることから盛んに研究されているが、過去の育種学・遺伝学的アプローチではその全容を明らかにすることは出来ていない。また近年、$F_1$ 雑種におけるヒストン修飾の変化を伴った時計遺伝子の発現変化やトランスクリプトーム解析・メチローム解析等を用いたエピジェネティクスからのアプローチによって small RNA や DNA メチル化の $F_1$ 雑種における変化などが報告されている。しかしながら、報告される内容は一部混沌としており、また、最も重要な問題点であるそれらの変化を引き起こしているきっかけ（最上流因子）が何であるのかも分かっていない。
　我々はシロイヌナズナの種内系統間の中で顕著な雑種強勢を示すことが知られている組合せを用い、雑種強勢の最上流因子の解明を試みる。当該研究は、個体差や生育環境に起因する様々な要因が原因となってこれまで雑種強勢メカニズムの解明に至らなかったと考えた。そして $F_1$ 雑種で見られるバイオマスの増大に焦点を当て、個体差や生育に影響を与える栽培環境のばらつき・ストレスを極力排除した栽培系を確立した。そして、植物の中心代謝である光合成の活性化が雑種強勢の最上流で働くという仮説を立て、光合成関連形質評価及び時計遺伝子の関与の評価を行った。
【方法と結果】確立した栽培系を用いた結果、親系統と比較して $F_1$ 雑種において約 30%のバイオマス増加を確認した。光合成関連形質については、PAM クロロフィル蛍光測定器を用いた光化学系Ⅱの最大量子収率（Fv/Fm）の評価、ヨウ素染色による光合成産物の蓄積量の評価を行った。その結果、Fv/Fm の値に有意な差はなかったものの、$F_1$ 雑種におけるデンプン蓄積の増加を観察した。現在、クロロフィル濃度測定、メタボローム解析による更なる光合成の評価を進めている。時計遺伝子の発現は周期的な振幅を繰り返すが、恒明条件下においては明確な周期性は失われることが知られている。我々は雑種強勢に対する時計遺伝子の関与を評価すべく、恒明条件下において栽培を行った。すると、時計遺伝子が通常の振幅を示す栽培条件下と比較しても遜色ない雑種強勢が観察され、これは時計遺伝子の関与しない雑種強勢メカニズムの存在を示唆している。現在、恒明条件下で栽培した $F_1$ 雑種における時計遺伝子の発現周期性の挙動について定量 PCR による確認実験を進めているところである。これらのことから、現在の雑種強勢の説明の主流となりつつある時計遺伝子を介したモデルとは独立かつ光合成の活性化を最上流として据えた新規モデルについて議論したい。

heterosis, photosynthesis, regulation of gene expression

講演番号：3J31a08
講演日時：3 月 19 日 11:15～ J 校舎 31 会場

# トマトにおけるアルドケト還元酵素の遺伝子発現機構と機能解析
# Investigation of gene expression mechanism and function of an aldo-keto reductase in tomato

○末川 麻里奈、藤川 愉吉、江坂 宗春（広島大院生物圏）
○Marina SUEKAWA, Yukichi FUJIKAWA, Muneharu ESAKA (Hiroshima Univ.)

【目的】

アルドケト還元酵素(Aldo-Keto Reductase ; AKR)ファミリーは、糖やステロイドなど様々な生体物質を代謝する酵素群である。植物では、AKR は一次・二次代謝に幅広く関与することや、種々のストレスによって生じる活性カルボニル化合物を除去して、ストレス耐性に寄与することが知られている。当研究室では、トマトにおいて、塩や酸化ストレス、およびジャスモン酸やサリチル酸などの植物ホルモンによって著しく遺伝子発現が増加するトマト AKR に着目している。これまでに、トマト AKR は、その遺伝子の開始コドンから上流-600 bp~-500 bp の領域に、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターと同程度の高い転写活性に関わるシス因子を持つことを明らかにしている。また、トマト AKR は、カルボニル化合物であるグリセルアルデヒドやメチルグリオキサール、グリオキサールに対して酵素活性を示すことも明らかにしている。本研究では、トマト AKR プロモーターの高い転写活性に関わる転写因子を探索するとともに、トマト AKR 過剰発現体を用いて、トマト AKR がストレス耐性に関わるかどうかを評価する。

【方法・結果】

最初に、トマト AKR プロモーター-600 bp~-500 bp について、シス因子を検索したところ、bZIP 型転写因子が結合する G-box 様配列が 2 つ存在することが明らかになった。さらに、マイクロアレイのデータベースを用いた探索から、組織や生育段階、ストレス応答において、トマト AKR と非常に類似した遺伝子発現傾向を示す bZIP 型転写因子 anaerobic basic leucine zipper1(ABZ1)の存在が明らかになった。そこで、塩や酸化、嫌気ストレスにおけるトマト AKR と ABZ1 の遺伝子発現をノーザンブロットによって比較した。その結果、塩や酸化ストレスにより、トマト AKR の遺伝子発現誘導が認められた。一方、ABZ1 の遺伝子発現は、いずれのストレスにおいても認められたものの、塩や酸化ストレスによる遺伝子発現の変動は認められなかった。現時点において、トマト AKR は ABZ1 の標的遺伝子かどうか不明である。次いで、トマト AKR がストレス耐性に関わるかどうかを評価するため、トマト AKR を過剰発現させたタバコ植物体を作出した。現在、トマト AKR 過剰発現タバコ植物体を用いて種々のストレス処理を行い、新鮮重量や根の長さなどを野生株と比較して、トマト AKR の過剰発現によってストレス耐性が向上するかどうかを評価している。

aldo-keto reductase, tomato, oxidative stress

講演番号：3J31a09
講演日時：3 月 19 日 11:30～ J 校舎 31 会場

アスコルビン酸生合成主要因子 VTC2 の発現を調節する転写因子の機能解析
Analysis of transcription factors involved in regulating the expression of VTC2, which is master regulator in ascorbate biosynthesis
○崎下 絢子[1]、瀬古 友梨恵[2]、田部 記章[2]、田中 裕之[3]、田茂井 政宏[1,2]、重岡 成[1,2] ([1]近畿大院・農・バイオ、[2]近畿大・農・バイオ、[3]宇都宮大・バイオ)
○Ayako Sakishita[1], Yurie Seko[2], Noriaki Tanabe[2], Hiroyuki Tanaka[3], Masahiro Tamoi[1,2], Shigeru Shigeoka[1,2] ([1]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kindai Univ., [2]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kindai Univ., [3]Biosci. Res. Edu., Utsunomiya Univ.)

【緒言】アスコルビン酸(AsA)は植物細胞内に高濃度存在し、生理応答調節の根幹を担う水溶性の多機能性化合物である。AsA の生合成は D-フルクトース 6-リン酸を初発物質とした D-マンノース/L-ガラクトース経路を主経路としており、明期においてその合成量が増加する。この経路に関与する遺伝子のうち、*GDP-L-galactose phosphorylase*(*VTC2*)の光応答は最も顕著であり、AsA 生合成の明暗制御の主要因子と考えられている。最近、*VTC2* の 5’UTR 領域から翻訳される短鎖ペプチドが AsA レベルを負に制御することが明らかにされたが、*VTC2* 遺伝子の発現制御機構については未だ不明な点が多く残されている。これまでに、*VTC2* のプロモーター領域を解析した結果、*VTC2* の転写開始点上流-70 から-118 bp の配列が光応答性に必須なシス配列であることを見出し、酵母 one-hybrid 法によりこのシス配列に特異的に結合する 3 つの転写因子(*VTC2* cis-binding protein: VCP)を同定した。また、レポーターアッセイによって、VCP1 は転写促進因子、VCP2、VCP3 は転写抑制因子である可能性が示唆された。このうち、*VCP1* 遺伝子破壊株を用いて、明期／暗期における AsA 定量およびレポーターアッセイを行い、*VTC2* プロモーター領域を介した細胞内 AsA レベル制御機構への関与について解析した。
【方法と結果】*VCP1* エキソンに T-DNA が挿入された *vcp1* 株を単離し、RT-PCR により *VCP1* の発現が完全に欠損されたヌル変異株であることを確認した。2 週齢の野生株と *vcp1* 株を暗処理した後に、明期/暗期 48 時間静置した際の葉における AsA 量を測定した結果、両条件ともに野生株と *vcp1* 株間で差はみられなかった。次に、*VTC2* の光応答性への *VCP1* 遺伝子欠損の影響を解析するために、*vcp1* 株を用いてレポーターアッセイを行った。その結果、*VTC2* シス配列を含むコンストラクトを用いた場合には、*VTC2* の光応答は野生株と同様の傾向を示した。一方で、*VTC2* シス配列を欠損させたコンストラクトを用いた場合には、*VCP1* 一過性発現による *VTC2* の発現誘導はコントロールと比較して高値を示した。このことは、*VCP1* がシス配列以外の配列を介した発現制御にも関与していることを示唆した。*VTC2* の 5’UTR 配列には、これまでに報告されている VCP1 の結合配列が 2 箇所存在していた。そこでこれらの配列を変異させたコンストラクトを用いてレポーターアッセイを行った結果、5’UTR 配列の変異は、*VCP1* 一過性発現による *VTC2* 遺伝子の発現を強く促進した。これらの結果は、VCP1 は *VTC2* シス配列のみでなく、5’UTR 配列を介した *VTC2* 遺伝子の発現制御に関与する可能性を示唆している。

ascorbate, *VTC2*, transcription factor

講演番号：3J31a10
講演日時：3 月 19 日 11:45～ J 校舎 31 会場

葉緑体型 *APXII* の選択的スプライシング制御因子の同定
Identification of splicing factor involved in the regulation for alternative splicing of chloroplastic *APXII*

大原 晨亜[1]、○田部 記章[1]、吉村 和也[2]、田茂井 政宏[1]、重岡 成[1]([1]近畿大・農・バイオ、[2]中部大・応生・食栄)
SHINA OHARA[1], ○NORIAKI TANABE[1], KAZUYA YOSHIMURA[2], MASAHIRO TAMOI[1], SHIGERU SHIGEOKA[1] ([1]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kindai Univ., [2]Dept. Food Nutr. Sci., Coll. Biosci. Biotech., Chubu Univ.)

【目的】ホウレンソウなどの多くの植物において、活性酸素消去酵素である葉緑体型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ（APX）は、1 つの遺伝子(*APXII*) からストロマ型（sAPX)とチラコイド膜結合型(tAPX)の mRNA が選択的スプライシング(AS)により組織特異的に発現制御されている。この選択的スプライシング機構はイントロン 12 に存在するスプライシング制御配列(SRE)によって制御されており、SRE と相互作用する核タンパク質の存在が示唆された（Yoshimura et al., 2002)。ところで、sAPX と tAPX が別々の遺伝子にコードされているシロイヌナズナにホウレンソウ *APXII* の選択的スプライシングに必須の配列を導入したところ、正確に選択的スプライシングされた。このことはシロイヌナズナにも SRE を介した選択的スプライシング制御機構が保存されており、SRE を認識するスプライシング制御タンパク質の存在を示唆する。そこで、本研究ではシロイヌナズナを用いて、SRE を介して *APXII* の選択的スプライシング効率を制御するタンパク質の同定を試みた。

【方法と結果】ホタルルシフェラーゼ(Fluc)遺伝子を分断するように、*APXII* 遺伝子のイントロン 11 から SRE を含むイントロン 12 までの選択的スプライシングに必須な配列と融合させたキメラ遺伝子を作成し、tAPX 型に選択的スプライシングされた場合のみ発光するシロイヌナズナ形質転換株を作出した。得られた $T_3$ 世代の植物体で Fluc 由来の発光および高いルシフェラーゼ活性が検出された。続いて、ウエスタンブロッティングにより Fluc タンパク質の発現を確認した。また、*in vivo* スプライシングアッセイにより、sAPX 型および tAPX 型の転写産物が発現していることを確認した。次に、形質転換株種子を変異原（EMS）処理し、$M_2$ 世代における Fluc 発光消失株をスクリーニングした。これまでにコントロール株と比較して Fluc 発光の弱い 1 株の変異株を単離した。同株における導入遺伝子の選択的スプライシング効率を解析した結果、選択的スプライシングが抑制されていた。さらにこの株では Fluc タンパク質の発現も抑制されており、ルシフェラーゼ活性も低下していた。現在、変異遺伝子同定のためにコントロール株への戻し交配を行っている。

alternative splicing, chloroplast, plant

講演番号：3J31p01
講演日時：3 月 19 日 14:00～ J 校舎 31 会場

糖鎖修飾改変植物体によるヒトβ-glucoserebrosidase 生産
The production of ß-glucoserebrosidase in glycoengineered *Nicotiana tabacum*
○佐藤 圭悟[1]、弓岡 仁美[1,2]、土肥 浩一[1]、磯山 純子[1]、大橋 貴生[1]、三﨑 亮[1]、藤山 和仁[1] ([1]阪大・生工国際セ、[2]大阪成蹊短大・栄養)
○Keigo Sato[1], Hitomi Yumioka[1,2], Koichi Dohi[1], Junko Isoyama[1], Takao Ohashi[1], Ryo Misaki[1], Kazuhito Fujiyama[1] ([1]Osaka Univ., [2]Osaka-seikei college)

現在、世界中でおよそ 5,000 人がゴーシェ病を患い、苦しんでいる。ゴーシェ病は、β-グルコセレシダーゼ(GCase)の先天的遺伝子異常が原因で発病する。この酵素は通常、リソソーム内でグルコセレブロシドを分解する役割を担っているが、GCase が欠損するとグルコセレブロシドが蓄積し、肝臓や脾臓が腫大していく。希少病であるゴーシェ病の主な治療法は、体外から不足している酵素を補う、酵素補充療法である。

近年、遺伝子組み換え技術などによる、チャイニーズハムスター卵巣由来(CHO)細胞によるバイオ医薬品生産が急速に発展しており、酵素補充療法で用いられる GCase も主に CHO 細胞を用いて生産されている。しかし、CHO 細胞による発現系は培養槽の設置や維持などに費用がかかり、高コストな発現系であることが問題として指摘されている。実際にゴーシェ病酵素補充療法で用いられる GCase の Cerezyme®は、最も薬価が高い薬の一つと言われている。そこで CHO 細胞に変わる有用な生産宿主として、植物が注目されている。動物細胞に比べ、生育が簡便な植物は非常に安価な発現が期待され、動物病原体混入のリスクも減るため、安価で安全な発現系であると言える。しかし、タンパク質に付加した *N*結合型糖鎖構造の違いが問題として挙げられている。一般に *N*結合型糖鎖は、付加したタンパク質の活性、分泌、フォールディングなどに密接に関わっている。そして糖鎖構造は、発現宿主により異なっており、植物においては、α1,3-fucose、β1,2-xylose 残基を有することが特徴である。この植物特異的な糖残基は、抗原性になりうることが指摘されている。そこで我々は、糖鎖修飾酵素の遺伝子の発現を遺伝子組み換え技術により制御することで糖鎖修飾改変をした *Nicotiana tabacum* を作出した。この植物体は、植物特異的な糖残基付加を抑制し、さらに糖鎖構造を Man5GlcNac2(M5)構造に集約するように制御されている。GCase が細胞内に取り込まれ、リソソームへ運搬される際、マンノース 6 リン酸受容体の認識を必要としている。GCase の糖鎖構造を M5 構造単一に制御することで、安定に高効率で細胞内へと取り込まれていく可能性が期待できる。

本研究では、この糖鎖改変植物体と GCase 発現株を交配させ、GCase 発現を試みた。qRT-PCR により糖鎖修飾酵素の発現が親株同様に制御されていることが示し、Western blot の結果、改変体にて GCase 発現を確認した。これにより、植物型糖鎖付加が少なく、M5 糖鎖に集約された GCase の発現が予想できる。この GCase を発現する糖鎖改変植物体は、より有用なゴーシェ病治療薬の生産基盤として期待される。

Glycoenngineering, Recombinant protein, *N*-glycan

発表責任者：佐藤圭悟（sato_keigo@icb.osaka-u.ac.jp）

講演番号：3J31p02
講演日時：3 月 19 日 14:15～ J 校舎 31 会場

# 外来タンパク質をイネ種子プロテインボディタイプ I 内部に局在化させるためのプロラミン部分配列の特定

# Identification of the prolamin portion sequences to localize the foreign proteins in rice seed protein body type I

○佐生 愛[1]、重光 隆成[1]、森田 重人[1,2]、増村 威宏[1,2]（[1]京都府立大学・生命環境、[2]京都府農技セ・生資セ）
○Ai SASOU[1], Takanari SIGEMITSU[1], Shigeto MORITA[1,2], Takehiro MASUMURA[1,2] ([1]Kyoto Pref. Univ., [2]Kyoto Pref. Agri., Forestry and Fisheries Technol. Res. Center)

【研究背景と目的】

イネ種子胚乳には，小胞体 (ER) 由来のタンパク質貯蔵器官であるプロテインボディタイプ I (PB-I) が存在し，複数種のプロラミンが層状に蓄積している．以前の研究で，各種プロラミン成熟ポリペプチドと GFP の融合タンパク質をネイティブプロモーター制御下で発現させると，GFP が PB-I 内部の特定層に局在することを示した．この結果より，外来タンパク質を PB-I 内部に蓄積させるためにプロラミンポリペプチドが利用可能であると示唆されたが，プロラミンは疎水性であるため，融合するタンパク質の立体構造や生理活性に影響を与える可能性があると考えられる．そこで，目的タンパク質への影響を最小限にするため，プロラミンの部分配列を利用することを考えた．本研究では、融合した外来タンパク質を PB-I に局在化させるために最低限必要な各種プロラミンの部分配列長を調査した．

【材料・方法と結果】

13 kDa プロラミンの中で相同性の高い 13a プロラミン（Cys を含む）と 13b プロラミン（Cys を含まない）を用い，開始メチオニンから約 20 残基ずつ伸長した部分配列と GFP の融合タンパク質をネイティブプロモーター制御下で発現する遺伝子組換えイネを作出した．

組換えイネ種子の顕微鏡観察の結果，13a プロラミンでは，N 末端側の最初の Cys 残基を含む部分配列が存在すれば融合タンパク質は PB-I に局在した．13b プロラミンでは，融合タンパク質が PB-I に局在するためには 13a プロラミンよりも長い部分配列が必要であることが明らかになった．

また，還元剤添加/無添加，または SDS 無添加のバッファーによるタンパク質抽出実験やハイドロパシープロット解析の結果から， 13a プロラミン部分配列では，疎水性の性質と Cys 残基を介したジスルフィド結合の形成によりプロラミン部分配列-GFP 融合タンパク質が PB-I へ局在することが示唆された．一方で，13b プロラミンは疎水性の性質のみによってプロラミン-GFP 融合タンパク質が PB-I へ局在していることが示唆された．

本研究の結果より，目的タンパク質を PB-I へ局在させるために最低限必要な 13a/13b プロラミンの部分配列長が明らかとなった．

prolamin, GFP, protein body

発表責任者：増村 威宏（masumura@kpu.ac.jp）

講演番号：3J31p03
講演日時：3 月 19 日 14:30～ J 校舎 31 会場

新規なゲノム編集ベクターと高密度水耕栽培法を利用したコメ品質関連遺伝子の多重改変
A trial to improve rice quality by using a novel genome editing vector and a versatile idea for high-density crop hydroponics in a plant incubator
○黒田 昌治、山口 知哉、山川 博幹（農研機構・中央農研）
○Masaharu Kuroda, Tomoya Yamaguchi, Hiromoto Yamakawa (NARO)

ゲノム編集技術は、今後の農作物育種のキーテクノロジーである。そこで我々は、以前に開発した制限酵素のみで遺伝子多重連結ができるバイナリーベクター[1]を基盤として、最小限の手順でベクター構築が出来て、かつ複数の標的遺伝子の改変にも対応しうる新規なイネ用ゲノム編集ベクターを作製した。このベクターを用いて、GFPを過剰発現するイネに対してGFP破壊コンストラクトを導入したところ、蛍光が消失したカルス全てでGFP遺伝子が破壊されていることを確認した。上記ベクターを用いて、コメ品質低下の要因となるアミラーゼ遺伝子等[2]の複数破壊を試みており、現在までの経過を報告する。

一方で、作物は植物体が大きくて種子の収穫まで時間がかかるため、ゲノム編集研究を行うには隔離温室等の設備的ハードルが研究発展の阻害要因となる。そこで我々は、簡便に植物体を高密度に水耕栽培する方法（Single-tube hydroponics）を開発した[3] [4]。この方法は、汎用型のインキュベーターと汎用機材を用いる省力・低コストの設計となっており、1台のインキュベーターでイネ288個体を栽培できる。また元々イネ用に開発した本方法は、畑作物や野菜類にも適用できる汎用性がある。スクリーニングから種子収穫まで限られたスペースを最大限に活用できることから、ゲノム編集研究をはじめとした基礎研究全般に極めて有用である。

[1] Kuroda M.(2010) Biosci. Biotechnol. Biochem.74, 2348-2351
[2] Hakata M.(2012) Plant Biotechnol. J. 10, 1110-1117
[3] Kuroda M.(2015) Biosci. Biotechnol. Biochem.79, 63-67
[4] http://www.naro.affrc.go.jp/project/results/laboratory/narc/2014/narc14_s11.html

水耕栽培法については、マニュアル等による技術移転にも対応しており、ご興味のある方は発表者（kurodama@affrc.go.jp）までお問い合わせください。

Genome editing, Rice, Hydroponics

発表責任者：黒田昌治（kurodama@affrc.go.jp）

講演番号：3J31p04
講演日時：3 月 19 日 14:45～ J 校舎 31 会場

# イネ種子貯蔵タンパク質変異体 *esp2* に由来する交配後代系統における胚乳含有成分の網羅的解析

Comprehensive analysis of seed storage compounds in rice inbred lines derived from *esp2* mutant.

○堀 清純[1]、飯島 健[1]、山本 敏央[1]、川越 靖[1]、奥西 智哉[2] ([1]農研機構作物開発セ、[2]農研機構食品部門)
○ Kiyosumi HORI[1], Ken IIJIMA[1], Toshio YAMAMOTO[1], Yasushi KAWAGOE[1], Tomoya OKUNISHI[2] ([1]NICS, [2]NFRI)

【目的】1960 年代以降、国内の米消費量は減少傾向にある。炊飯米と差別化した様々な用途のイネ品種の開発により、米価の維持、休耕田の有効利用、食料自給率向上が求められている。イネ *esp2* 突然変異体は、Protein disulfide isomerase-like protein 1-1 (PDIL1-1) の酵素活性が欠損した種子貯蔵タンパク質変異体である。*esp2* 変異体では、グルテリン前駆体とプロラミンが分子間ジスルフィド結合を形成して胚乳中に蓄積している。これまでの研究により、*esp2* 変異体は優れた米粉の加工特性を持ち、*esp2* 米粉を使用したパンは腰折れしにくくうどん麺にはコシがあることが明らかになっている。我々は、*esp2* 変異体と栽培品種のコシヒカリやタカナリとの交配を行い、栽培特性の向上した米粉用イネ系統を作出してきた。本研究では、*esp2* 変異を持つ作出系統について、種子貯蔵タンパク質、デンプン、低分子化合物の網羅的解析を行い、胚乳成分の特徴を明らかにすることを試みた。
【試料および方法】2016 年に茨城県つくば市の試験圃場で収穫したコシヒカリ、*esp2* 変異を持つコシヒカリ系統、タカナリ、*esp2* 変異を持つタカナリ系統を供試した。これらの精白米を粉砕した米粉について、アミロース含有率を測定するとともに SDS-PAGE により貯蔵タンパク質特性を調査した。さらに、米粉 50mg から低分子量化合物を抽出し、CE-TOFMS に供試した。
【結果】コシヒカリと比較して、*esp2* 変異を持つコシヒカリ系統はアミロース含有率が 1-2%程度高い値を示した。また、*esp2* 変異を持つコシヒカリ系統では、グルテリン前駆体の高蓄積を確認した。低分子化合物の網羅的解析では、合計 213 種類の候補化合物（代謝物質）を検出した。候補化合物の中には、各種のアミノ酸類 (Alanine、Asparagine など) や有機酸類 (Glucosaminic acid、Frulic acid など) が含まれていた。検出した全ての候補化合物を変数にした主成分分析の結果、各系統間の違いは明確であった。コシヒカリと比較して、*esp2* 変異を持つコシヒカリ系統ではアミノ酸等の一部の候補化合物が増加していた。*esp2* 変異を持つタカナリ系統においても同様の傾向が観察されたことから、これらの検出した胚乳成分の含有量や組成の違いが、米粉の加工特性の向上に関係している可能性が考えられる。

本研究は、農林水産省「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業 (28014B)」の支援を受けて実施した。

Seed storage components, Rice flour, Processing suitability

発表責任者：堀清純（horikiyo@affrc.go.jp）

講演番号：3J31p05
講演日時：3 月 19 日 15:00～ J 校舎 31 会場

維管束分岐の促進、ダイクロマティズム、および上偏生長を利用した花の組換え育種
Transgenic breeding of torenia flowers through excessive vasculature branching, dichromatism or epinasty

○笠島 一郎[1,2]、大坪 憲弘[1,3]、佐々木 克友[1]（[1]農研機構、[2]岩手大農、[3]京都府大生環）
○Ichiro KASAJIMA[1,2], Norihiro OHTSUBO[1,3], Katsutomo SASAKI[1] ([1]NARO, [2]Iwate Univ., [3]Kyoto Pref. Univ.)

花の形状や色といった形質を多様化させることで消費者を魅了することは、花卉育種の主要な目標の一つである。今回我々は、花で発現する遺伝子のプロモーターとキメラリプレッサー遺伝子を組み合わせることで花の形質がどのように変化するか調査した。

我々はまず、ＤＮＡ抽出が困難な園芸植物からでもＤＮＡが抽出できる「アルカリＰＶＰＰ法」を開発しシクラメンから純度の高いＤＮＡを大量に抽出した（１、２）。次に、配列を改良したアダプターを用いて、ＰＣＲによりシクラメンの花で発現する遺伝子のプロモーターを単離した（３）。さらに、これらのプロモーターの制御下でキメラリプレッサー遺伝子を発現する配列を３２種類作製した。これらの配列を遺伝子組換えによりトレニアに導入した（４）。導入した配列のうち１２種類はトレニアの花の形質を様々に変化させた。変化した形質の中でも特徴的であった鋸歯（ギザギザ）、花弁の淡色化、花弁の反り返りについてさらに解析を行った。鋸歯状花弁はＴＣＰリプレッサーをシクラメンのＡＰ１プロモーターやＡＰ３Ｂプロモーターと連結した際に生じた。鋸歯状花弁では維管束が通常より密に発達しており、導入した配列が維管束の分岐を促進したと考えられる。淡色化した花弁は通常の花弁（紫色）よりも青っぽく見えた。また、ブロッチが消失した。この形質はＳＥＰ３リプレッサーをシクラメンのＣＨＳプロモーターと連結した際に生じる。花弁表面の反射分光スペクトルを色彩学的に評価したところ、この色相の変化はダイクロマティズムによりもたらされるものであると考察された。花弁の反り返りはＴＣＰリプレッサーをシクラメンのＤＦＲプロモーターと連結すると現れる。表皮細胞の数が組換え体の花弁上面で増加したことで上偏生長が起きたと思われる。各プロモーターの活性と花の形質には関係性があるようで、例えばブロッチにのみ影響するＰＩプロモーターはブロッチのみで発現が観察された。形質が出やすいＡＰ３Ｂプロモーターは花弁で強く発現する一方、形質が全く出なかったＯＭＴプロモーターは発現も確認されなかった。即ち、各プロモーターとリプレッサーが花弁色、ブロッチ、花弁形状に対する特異性を有しており、これが合致すると各形質の変化が生じる。（１）Kasajima et al. 2013 Sci Hortic （２）笠島 2016 農業および園芸（３）Kasajima et al. 2014 Biosci Biotech Biochem （４）Kasajima et al. 投稿中

［謝辞］研究全般に渡り北興化学工業株式会社にご協力いただいた。本研究は農食事業により行われた。

flower, breeding, transgenic

発表責任者：笠島一郎（kasajima@iwate-u.ac.jp）

講演番号：3J31p06
講演日時：3 月 19 日 15:25～ J 校舎 31 会場

# 使用済みカイロを用いた鉄粉被覆種子加工方法の応用研究

# Study of seed processing method coated iron powder using disposable body warmer

○小路 美紀[1]、岡村 麻由[1]、青木 洋賢[2]、小川 智弘[2]、野村 正人[2]([1]近大院・システム工学、[2]近大工)
○Minori Shouji[1], Mayu Okamura[1], Hirotaka Aoki[2], Tomohiro Ogawa[2], Masato Nomura[2] ([1]Grad. Sch. System. Eng. Kindai Univ., [2]Kindai Univ.)

## 1. 緒 言

日本国内での稲作は主に苗代に種籾をまき，苗で育成してから水に植える「移植栽培」が主流となっている。また，最近の農業従事者の高齢化や従事者の減少により，育苗や移植作業などの手間の多い栽培法を行うことができない状況になりつつある。そこで，作業量が移植栽培と比べて少ない水田に直接種籾をまく「直播栽培」が再び注目されつつある。しかし，直播栽培には種まき時の種子の浮遊，鳥による種子の捕食害ならびに，稲が土壌で発芽しない苗立ちの不全などの欠点が多くある。そこで，従来の鉄粉被膜種子 [1)]の配合比の再検討とつなぎとなる材料を検討した．また，使用済み廃カイロの再利用と焼石膏の組み合わせなどを検討したところ，興味ある結果を得ることができたので報告する。

## 2. 実験方法

使い捨てカイロは，鉄粉，水，活性炭及びバーミキュライトを主成分としたものであり，日本では冬に全国で広く使用されている。これを原料として，焼石膏を混合（使い捨てカイロの重量に対して，1%，5%，10%及び 25%添加）して被覆加工コーティングを行ない，イネ種子，トウモロコシ及び大豆の被覆加工試験ならびに，25±2°C で発芽（シャーレ内）試験を行った。

## 3. 結果及び考察

使用済みの使い捨てカイロに添加した焼石膏の最適量（%）は，5%及び 10%であり，使用済みカイロ中の鉄粉に強固なコーティングとなることが分かった。以下，この条件でイネ種子，トウモロコシ及び大豆をコーティングし、それぞれの発芽率を求めた。その結果，イネ種子の発芽率は 10%及び 20%の添加（焼石膏）で 93～96%の値を得ることができた。さらに，トウモロコシ及び大豆ではそれぞれ 80%の発芽率を得ることができた。以上の結果から，使用済みカイロは「直播栽培」に適用することが可能となり、さらに，鳥による捕食害の低減にも役立つことが示唆された。

参考文献　1）鉄コーティング湛水直播マニュアル，農業・食品産業技術総合研究機構　近畿中四国農業研究センター(2010).

Disposable body warmer, Iron powder coating, Seed

講演番号：3J31p07
講演日時：3 月 19 日 15:40～ J 校舎 31 会場

# シダ植物培養細胞の予備凍結法による超低温保存

# Cryopreservation of pteridophyte cultured cells by pre-freezing method

○三國 智葉、安部 文貴、栗山 昭（東京電機大　院　理工）
○Tomoyo MIKUNI, Humitaka ABE, Akira KURIYAMA (Tokyo Denki Univ.)

## 緒論

動物、植物、微生物と様々な生物の遺伝子資源の長期かつ安定な保存法の確立の研究が進められている。植物培養細胞も遺伝子資源として有効である。例えば、植物体再生能のある細胞株や、特定の物質を効率的に生産する細胞株などは、遺伝子資源として有用である。植物培養細胞の長期保存法としては大きく 3 つに分けることができる。それは、予備凍結法、ガラス化法、乾燥法である。本研究では、植物体再生能の高いケラトプテリスカルスの予備凍結法による超低温保存を試みたので報告する。

## 材料及び方法

ミズワラビ科のケラトプテリス(*Caratopteris thalictroides*)植物体の腋芽から誘導した。誘導時とそれに続く継代培養は、ショ糖　3%(w/v)、BA　$1\times10^{-5}$M を含む MS 培地上で行った。予備凍結法の条件は、イネカルスの保存の条件に従った 1)。凍結前後及び再培養中のカルスの生存活性は、TTC 還元法により測定した 2)。

## 結果及び考察

凍害防御剤処理したカルスを、1℃/min の冷却速度で様々な温度まで予備凍結した後に生存活性を測定したところ、予備凍結温度が低下するにしたがって生存活性は低下した。予備凍結したカルスを液体窒素中で保存することなく融解し再培養すると、-30℃以下まで予備凍結したカルスでは、コロニー形成は見られなかった。また、予備凍結後液体窒素中で保存したカルスの生存活性は、融解直後と比べて生存活性は著しく低下したものの、予備凍結温度により生存活性に大きな差は見られなかった。現在のところ、液体窒素中に保存したカルスからのコロニー形成は確認されていない。今後、前培養による低温耐性の付与、凍害防御物質の組み合わせの検討を行う予定である。

## 文献

1) Plant Science 64, 231-235 (1989)
2) Plant Physiol. 42, 1423-1426 (1967)

Plant cultured cells, Cryopreservation, Pteridophyte

発表責任者：三國　智葉（16rmb12@ms.dendai.ac.jp）

講演番号：3J31p08
講演日時：3 月 19 日 15:55～ J 校舎 31 会場

# *Agrobacterium* 法により作出した *Mentha aquatica* 形質転換体の金属耐性

*Agrobacterium*-mediated transgenic *Mentha aquatica* having metal tolerance

○田渕 晃、小野里 真志、飯塚 万結香、栗田 将平 (信大農)
○Akira Tabuchi, Masashi Onozato, Mayuka Iizuka, Shouhei Kurita (Shinshu Univ.)

私達の研究室では，Agrobacterium 法によりミントの形質転換体を作出し,その解析を行ってきた．シソ科ハッカ属に分類されるミント植物は，比較的繁殖力が強く，栄養繁殖をも行い，金属に対する耐性も比較的強い．今回，私達は，*Mentha aquatica*（ウォーターミント)を用いて，金属結合性タンパク質であるヒト由来メタロチオネイン遺伝子（MT 遺伝子）が導入された形質転換体の作出を試み，得られた形質転換体について，その重金属耐性の調査を行った．

【方法】

先ず、*M. aquatica* 形質転換体の作出を，以下のように行った．*Agrobacterium rhizogenes* 野生株およびプラスミド pBI121 または GUS 遺伝子を MT 遺伝子に置換したプラスミド pBI121-*MTL1* を保有する *A. rhizogenes* を用いて，直接接種法により，*M. aquatica* 茎切片から毛状根を誘導し，さらに，毛状根から再生植物体を得た．得られた再生体に目的の遺伝子が導入されている事を確認した後，金属耐性試験を以下のように行った．

GamborgB5(B5)固体培地で，２週間培養を行った後，葉 4 枚を有する植物体（野生株および pBI121 の T-DNA 領域が導入された形質転換体である P6 系統）を，濃度が 0 ～100 mg/L である銅，亜鉛，鉛，マンガン，およびニッケルを含む B5 培地に移植した．26℃，16 時間明期で培養し，植物体の生育を観察した．さらに，植物体（野生株，Ｐ６系統株，および MT 遺伝子が導入された形質転換体 M5 系統株）の葉を 0 ～ 300 mg/L の銅水溶液を入れたシャーレに浮かべ，26℃，16 時間明期で培養し，葉の変色による耐性の有無を観察した．一方，野生株と比較し耐性があると判断された形質転換体を用いて，GUS の発現を調査した．

【結果】

銅，亜鉛，鉛，マンガン，ニッケルを含む固体培地に移植し，植物体の生育を観察した結果，P6 系統株は，銅およびマンガンにおいて，野生株より耐性のあることを示唆する結果を得た．一方，水溶液を用いて銅の耐性を観察した結果においても,Ｐ６系統ならびにＭ５系統の各々は,野生株と比較し，銅に対し耐性があることを示唆する結果を得た．さらに，銅に対し耐性が示された形質転換体の GUS 遺伝子の発現を調査した結果，葉の周辺部において，その発現が観察された．このことから，MT 導入株においても，MT 遺伝子は主に葉の周辺部で発現していることが示唆された．

*Mentha aquatica* , phytoremediation, Agrobacterium

講演番号：3J31p09
講演日時：3 月 19 日 16:10～ J 校舎 31 会場

# 陸上植物の進化過程と桂皮酸モノリグノール生合成能の獲得に関する研究

Studies on cinnamate/monolignol biosynthetic pathway.

○古畑 美帆[1]、杉山 結郁[1]、西浜 竜一[2]、山岡 尚平[2]、河内 孝之[2]、岡澤 敦司[1]、太田 大策[1] ([1]大阪府大生命環境、[2]京大生命科学)

○Miho FURUHATA[1], Yui SUGIYAMA[1], Ryuichi NISHIHAMA[2], Shohei YAMAOKA[2], Takayuki KOHCHI[2], Atsushi OKAZAWA[1], Daisaku OHTA[1] ([1]Osaka Prefecture Univ., [2]Kyoto Univ.)

リグニンは植物細胞壁に蓄積する疎水性の芳香族ポリマーであり，細胞壁への物理的強度の付与・水や養分，代謝物の輸送・微生物に対する抵抗性に寄与している．リグニンモノマー生合成経路である桂皮酸モノリグノール経路はシダ植物以上の維管束植物に存在するが，維管束を持たないコケ植物ではその存在は明らかではない．蘚類ヒメツリガネゴケ（*Physcomitrella patens*）および苔類ゼニゴケ（*Marchantia polymorpha*）とシロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）の比較ゲノム解析から，coumarate 4-hydroxylase（C4H），hydroxycinnamoylCoA:shikimate/quinate hydroxycinnamoyl transferase（HCT），*p*-coumarate 3'-hydroxylase（C3'H，CYP98A3）はコケ植物にも存在するが，ferulate 5-hydroxylase（F5H，CYP84A1）は存在しないことがわかった．さらに酵素学的解析から，ヒメツリガネゴケ HCT（PpHCT）はシロイヌナズナ HCT（AtHCT）と同じく shikimate ならびに quinate に対する基質反応性を保持する一方で，ヒメツリガネゴケ CYP98A（PpCYP98A）はシロイヌナズナ CYP98A3 と異なる基質反応性を有することが示唆された．このことから，コケ植物 CYP98A は高等植物型 CYP98A と異なる化合物を本来の反応基質としており，進化過程においてリグニン生合成に利用されたと推察された．そこでコケ植物体内でモノリグノール生合成経路を構築し，コケ植物にモノリグノール生合成能を付与しうるかを検証することとした．

本研究ではコケ植物にシロイヌナズナの HCT，CYP98A3，および CYP84A1 を導入し，植物体内での代謝や表現型にどのような変化が認められるかを検証することとした．形質転換には，近年ゲノム情報が整備され，形質転換系が確立されているゼニゴケを用いた．これまでに AtHCT, CYP98A3, CYP84A1, AtHCT + CYP98A3, AtHCT + CYP98A3 + CYP84A1 の導入系統を獲得した．CYP84A1 導入系統および HCT + CYP98A3 + CYP84A1 導入系統では生育遅延ならびに葉状体の形態異常が認められた．現在サザンブロット解析ならびに RT-PCR による発現量解析を行っている．今後これらの形質転換体の代謝物解析とともに，リグニン蓄積の有無を検証する予定である．

cinnamate/monolignol pathway, Bryophytes, evolution

講演番号：3J31p10
講演日時：3 月 19 日 16:25～ J 校舎 31 会場

Alteration of galactosylation in tobacco cell wall matrix by co-expression of UDP-galactose transporter and UDP-Glc/ UDP-Gal epimerase genes.

○Tayebeh Abedi[1], Toshihisa Kotake[2], Nobukazu Tanaka[1] ([1]Hirohima Univ., [2]Saitama Univ.)

**Background;** UDP-galactose (UDP-Gal) is one of the most important precursors in galactosylation of plant cell wall matrix and glycoproteins. In the Golgi body, addition of Gal to the reduced end of sugar chains of cell wall component and arabinogalactan proteins (AGPs), important proteoglycans for plants growth and development, is done by the glycosyltransferases. Efficiency of these enzymes depends on the activity of two main factors; UDP-Glc/UDP-Gal epimerase (UGE) and UDP-Gal transporter (UGT). In cytosol, UGE interconverts UDP-Gal from/to UDP-Glc, while UGT transports UDP-Gal to Golgi. In our previous work, overexpression of *hUGT1* (human UGT) in tobacco displayed hyper-galactosylation in AGPs and cell wall components. However, *AtUGE2* overexpression had no effect on galactosylation. The aim of this study is to investigate the influence of co-expression of *AtUGE2* and *hUGT1* genes on AGP polysaccharide and cell wall component.
**Methods;** Crossing between different *AtUGE2*-transgenic lines and one of the *hUGT1*-transgenic lines (6×hUGT1, 8×hUGT1, 11×hUGT1, 17×hUGT1, 21×hUGT1), pBIN19×hUGT1 and pBIN19×pBIN19 (as a control) was done. Genes expression at transcription level was tested by RT-PCR. Hybrid lines ($6^{th}$ and $11^{th}$ leaves) were tested for AGP polysaccharide quantification using colorimetric method based on ß-Yariv reagent reactivity, and sugar composition in total cell wall was analyzed with HPLC by ABEE labeling method.
**Results;** From 37 hybrid plants with desired genes, 22 hybrids with high *AtUGE2* and *hUGT1* genes expression and 3 pBIN19×pBIN19 were selected. AGP polysaccharide assay revealed significant difference between control and hybrid ($P<0.01$). In $6^{th}$ leaves, pBIN19×hUGT1, 11×hUGT1, 6×hUGT1 and 17×hUGT1 showed the highest amount of AGP polysaccharide. Analysis of $11^{th}$ leaves revealed the highest AGP polysaccharide content in pBIN19×hUGT1, 17×hUGT1 and 6×hUGT1. HPLC analysis of hybrid lines and control plants showed remarkable difference in Gal content of their cell wall sugar component ($P<0.05$). pBIN19×hUGT1, 17×hUGT1, 21×hUGT1 and 11×hUGT1 had the highest Gal percentage in cell wall components of $6^{th}$ leaves. Besides, pBIN19×hUGT1 and 17×hUGT1 showed maximum Gal content in $11^{th}$ leaves. Leaf number counting showed no difference among hybrids, although there was significant difference among height of hybrids. pBIN19×hUGT1 and 17×hUGT1 were the tallest hybrids compared to control. To sum up, these results reveal *hUGT1* gene has an important role in galactosylation compared to *UGE2* gene, because none of UGE2×hUGT1 hybrid lines showed higher galactosylation of AGP and cell wall component than pBIN19×hUGT1. In addition, it is likely that difference among various hybrids lines not affected by *UGE2* gene expression level.

Arabinogalatan proteins, UDP-Glc/UDP-Gal epimerase, UDP-Gal transporter

発表責任者：Noukazu Tanaka（ntana@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：3J31p11
講演日時：3 月 19 日 16:50～ J 校舎 31 会場

ソース/シンク能同時強化サツマイモの作出に向けたサツマイモ根特異的プロモーターの単離
Isolation of root specific promoter for genetic engineering of transgenic sweet potato enhanced sink/source capacity.
○冨本 優美[1]、田部 記章[2,5]、田茂井 政宏[1,2,5]、菊池 彰[3,5]、横田 明穂[4,5]、重岡 成[1,2,5]([1]近畿大院・農・バイオ、[2]近畿大・農・バイオ、[3]筑波大・GRC、[4]奈良先端大・先端科技推進セ、[5]JST, CREST)
○Yumi TOMIMOTO[1], Noriaki TANABE[2,5], Masahiro TAMOI[1,2,5], Akira KIKUCHI[3,5], Akiho YOKOTA[4,5], Shigeru SHIGEOKA[1,2,5] ([1]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kindai Univ., [2]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kindai Univ., [3]GRC, Tsukuba Univ., [4]Front. Sci. Tech. Promo. Ctr.,NAIST, [5]JST, CREST)

【目的】近い将来、我々の食糧や燃料が不足することが予想されており、遺伝子導入による高生産作物への期待が高まっている。イモ類は単位面積当たりの収穫量およびハーベストインデックスが栽培作物中でほぼ最大であることから、生産性向上のターゲット作物として適しており、二酸化炭素資源化に大いに有効である。これまでにカルビン回路で機能するラン藻 *FBP/SBPase* 遺伝子をサツマイモ由来ルビスコ（IbRbcS）プロモーター制御下で発現させることでソース能を強化した形質転換サツマイモ(IbFS)を作出した。IbFS は、非組換え体と比較して光合成活性が 1.4 倍上昇し、地上部の乾燥重量は非組換え体の 1.2 倍に増加していた。また、IbFS は節から形成される塊根の数も増加していた。本研究は、サツマイモバイオマスを更に増加させるために、野生種スイカより単離された *CLRan1* シンク能強化遺伝子とラン藻 *FBP/SBPase* 遺伝子を同時にサツマイモで発現させた形質転換体の作出を試みた。

【方法と結果】CLRan1 をサツマイモの地下部に特異的に発現させるプロモーターを単離するために、サツマイモの茎および不定根原基の遺伝子発現を RNA-seq により解析し、茎と比較して不定根原基での発現が 2 倍以上高い 6219 コンティグを得た。不定根原基での発現が高い 100 遺伝子には、他の植物における胚発生や細胞肥大に関するホモログが多数存在していた。また、任意に抽出した 22 遺伝子のサツマイモにおける組織特異性を RT-PCR により解析した結果、plant AT-rich sequence and zinc-binding protein のサツマイモホモログ(*IbPLATZ*)が不定根原基特異的発現を示すことを明らかにした。そこで、*IbPLATZ* のプロモーター領域として開始コドン上流-2000 bp を単離し、下流に GUS レポーター遺伝子を連結してシロイヌナズナに形質転換した。形質転換シロイヌナズナにおける GUS の発現は根特異的であり、特に根端に強く GUS の染色がみられた。そこで、*IbRbcS* プロモーター制御下で FBP/SBPase を、*IbPLATZ* プロモーター制御下で CLRan1 を発現させる同時強化コンストラクトを作製した。現在、アグロバクテリウムを介してサツマイモへの形質転換を行い、両遺伝子導入株の選抜を行っている。

sweet potato, transgenic plant, sink/source

講演番号：3J31p12
講演日時：3 月 19 日 17:05～ J 校舎 31 会場

ユーグレナへのトランスエノイル CoA 還元酵素遺伝子導入によるバイオ燃料生産性の向上
Expression of *trans*-2-enoyl-CoA reductase in *Euglena gracilis* leads to increases in biomass production

○田茂井 政宏[1,2]、野志 昌弘[1,2]、小川 貴央[2,3]、石川 孝博[2,3]、重岡 成[1,2]（[1]近大農、[2]CREST JST、[3]島根大生資科）
○Masahiro TAMOI[1,2], Masahiro NOSHI[1,2], Takahisa OGAWA[2,3], Takahiro ISHIKAWA[2,3], Shigeru SHIGEOKA[1,2] ([1]Kindai Univ., [2]CREST JST, [3]Shimane Univ.)

【目的】近年、藻類由来の次世代バイオ燃料が注目されている。真核藻類であるユーグレナは、好気条件下では光合成産物としてパラミロンを蓄積し、嫌気条件下に移行するとパラミロンを分解し、ワックスエステル発酵によりミリスチン酸（C14）とミリスチルアルコール（C14）からなるミリスチルミリステート（C28）を主成分とするワックスエステルを高生産する特徴を有する。我々はこれまでに、ラン藻のカルビン回路構成酵素であるFBP/SBPase遺伝子をユーグレナに導入することで、光合成機能が強化され、パラミロンおよびワックスエステル量が増加することを明らかにした（*Biotechnol. Biofuels* 8; 80）。しかし、ユーグレナにおけるワックスエステル生産性をさらに向上させるためには、パラミロンからワックスエステルへの変換効率の向上が重要であると考えられる。ワックスエステル生合成経路を構成する酵素の中で、トランスエノイルCoA還元酵素（TER1）の活性は他の関連酵素と比較して低く、律速段階であると推測される。そこで本研究では、ユーグレナ内在性のTER1（EgTER1）を過剰発現させた形質転換株を作出し、ワックスエステル生合成能の評価を行った。
【方法・結果】ユーグレナ内在性のGAPDHプロモーター/ターミネーターにEgTER1遺伝子を連結し、薬剤耐性カートリッジと連結後、エレクトロポレーションによりユーグレナ野生株へ導入した。抗生物質添加培地で選抜を繰り返して得られた薬剤耐性株（GAPDH-EgTER1）からゲノムを抽出し、PCRによりEgTER1遺伝子が導入されていることを確認した。GAPDH-EgTER1株のTER活性は、コントロール株の1.2～1.3倍に上昇していた。しかし、ウエスタンブロッティングによるTER1タンパク質の比較では、コントロール株とGAPDH-EgTER1株間に有意な差は認められなかった。次に、嫌気条件下におけるパラミロン利用効率へのEgTER1発現の影響を明らかにするため、光従属栄養条件および光独立条件下で定常期まで培養したユーグレナを嫌気処理し、経時的にパラミロン量を比較した。その結果、GAPDH-EgTER1株では嫌気条件下でのパラミロンの減少がコントロール株よりも早く、嫌気処理24時間後のパラミロン分解率は、GAPDH-EgTER1株で有意に増大していた。細胞内脂質量をBODIPY染色により評価したところ、脂質蓄積を反映する蛍光増大はコントロール株よりもGAPDH-EgTER1株で顕著に見られた。さらに、GC-MSにより細胞内のワックスエステル（C28）定量を行ったところ、コントロール株と比較してGAPDH-EgTER1株では有意に増加していることを明らかにした。以上より、EgTER1はパラミロンからワックスエステルへの変換効率を左右する重要な因子であり、ユーグレナへのEgTER1遺伝子導入によるバイオ燃料高生産化の有効性が示唆された。

Euglena, biofuel, transgenic

発表責任者：田茂井政宏（tamoi@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：3J31p13
講演日時：3 月 19 日 17:20～ J 校舎 31 会場

実用珪藻 *Chaetoceros gracilis* のバイオファクトリー化に向けた基盤技術の開発
Development of basic technologies to utilize the diatom *Chaetoceros gracilis* as a biofactory

○伊福 健太郎[1]、閻 東怡[1]、西出 浩世[2]、山本 義治[3]、内山 郁夫[2]、菓子野 康浩[4] ([1]京大院生命、[2]基生研、[3]岐阜大応用生物、[4]兵県大院生命理学)
○ Kentarou IFUKU[1], Dongyi YAN[1], Hiroyo NISHIDE[2], Yoshiharu YAMAMOTO[3], Ikuo UCHIYAMA[2], Yasuhiro KASHINO[4] ([1]Grad. Sch. Biostudies, Kyoto Univ., [2]NIBB, [3]Fac. Appl. Biol. Sci., Gifu Univ., [4]Grad. Sch. Life. Sci., Univ. of Hyogo)

【背景、目的】

漁業資源として大量培養が行われ、実用化されている中心目珪藻、ツノケイソウ(*Chaetoceros gracilis*)は、高い環境適応能と高油脂生産性を有し、物質生産のプラットフォームとしての利用が期待されている。また光合成研究などの基礎研究の材料としても優れた性質を有し、研究事例が増えている藻類である。そこでツノケイソウを利用して、光合成機能を最適化し、温暖化ガスの二酸化炭素を有用物質へと変換するための基盤技術の開発を進めた。

【方法、結果】

次世代シークエンスにより *C. gracilis* のドラフトゲノム配列を取得し、他珪藻２種のゲノム情報と、RNA-Seq の情報をあわせて、シークエンスデータのアッセンブル、および遺伝子領域の再予測を行った。その結果、14172 遺伝子が検出された。k-mer 頻度に基づく k-means クラスタリング、GC 含量およびカバレッジにより、葉緑体ゲノム配列の分離が可能であった。各々の遺伝子に対し、BLAST のトップヒット、および InterPro のドメイン予測を行った。

次に RNA-Seq の解析結果から推定された高発現遺伝子のプロモーター領域を 10 種取得し、形質転換ベクターを作成した。遺伝子導入には、我々が藻類に初めて応用した多重矩形波パルスエレクトロポレーション法を用いた。薬剤選抜に用いる抗生物質を探索したところ、1 mg/mL カナマイシンや 500 μg/mL ゲンタマイシンなどは増殖抑制効果がなく、ゼオシン、エリスロマイシン、ハイグロマイシン、ノーセオスリシンが増殖を阻害した。そこで選択マーカーとしてノーセオスリシン耐性遺伝子 (*nat*) を用いて発現ベクターを構築した。その結果、選抜したプロモーターを用いることにより、$10^8$ 細胞あたり約 450 の形質転換体という高い効率で形質転換体を得られるようになった。硝酸還元酵素の誘導型プロモーターを用いた場合には、硝酸塩の代わりにアンモニウム塩を含む培地で培養することで導入遺伝子の発現を抑え、特定の時期に硝酸塩を添加することにより、その発現を誘導できることを認めた。これによって導入遺伝子の発現時期の調節や最適化を行うことが可能となった。本形質転換系により、リシノール酸など、本来珪藻が生産しない有用物質生産能をツノケイソウに付与することができた。以上の結果から、ツノケイソウ（*Chaetoceros gracilis*）が、バイオファクトリーとして有用であることが示された。

diatom, transformation, biofactory

発表責任者：伊福　健太郎（ifuku@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3J31p14
講演日時：3 月 19 日 17:35～ J 校舎 31 会場

実用珪藻ツノケイソウにおけるリシノール酸生産
Production of ricinoleic acid-containing monoestolide triacylglycerides in an oleaginous diatom, *Chaetoceros gracilis*

○梶川 昌孝[1]、安部 竜樹[1]、伊福 健太郎[1]、古谷 憲一[1]、閻 東怡[1]、奥田 知生[2]、安藤 晃規[2]、岸野 重信[2]、小川 順[2]、福澤 秀哉[1] ([1]京大生命、[2]京大農)
○Masataka KAJIKAWA[1], Tatsuki ABE[1], Kentaro IFUKU[1], Ken-ichi FURUTANI[1], Dongyi YAN[1], Tomoyo OKUDA[2], Akinori ANDO[2], Shigenobu KISHINO[2], Jun OGAWA[2], Hideya FUKUZAWA[1] ([1]Grad. Biostudies, Kyoto Univ., [2]Grad. Agri., Kyoto Univ.)

藻類を供給源としたバイオ燃料生産については社会的要請もあり、高脂質・高炭化水素蓄積性の藻類の探索や、油脂蓄積の制御機構の研究が国内外において取り組まれている。また現段階では燃料として生産させるよりも、付加価値の高い有用物質の生産が現実的だと考えられる。我々は様々な工業製品の原料として利用可能なリシノール酸に着目した。現在、リシノール酸はトウゴマの種子油から精製されているが、トウゴマの種子は毒性物質をもつなどの問題点があり他生物での生産が期待されている。我々は微細藻が代替供給源となる可能性を示すため、水産業で牡蠣などの２枚貝の餌として商業的に利用される珪藻ツノケイソウ*Chaetoceros gracilis*が高油脂蓄積能を持つことから、この実用珪藻を用いてリシノール酸の生産の可能性を検討した[1)]。

麦角菌*Claviceps purpurea*由来のリシノール酸生合成酵素（オレイン酸ヒドロキシラーゼ、FAH）をコードする遺伝子*CpFAH*を野生型ツノケイソウに導入し、リシノール酸蓄積株を複数得た。最もリシノール酸を蓄積したCp4株を用いて、リシノール酸蓄積量の温度依存性を検討したところ、15ºCが最適であり、培養 7 日目に細胞あたり2.2 pgのリシノール酸を蓄積した。これは全脂質の構成脂肪酸の8.8%に相当する。FAHの基質であるオレイン酸（18:1）の供給量を増やすために、ツノケイソウの主要脂肪酸であるパルミチン酸（16:0）をステアリン酸（18:0）に変換する*Mortierella alpina*由来の鎖長延長酵素の遺伝子*MALCE1*をCp4株に導入した。二重形質転換株では、パルミチン酸はCp4に比べて60%まで減少する一方で、リシノール酸の含有量は1.5倍増加し、細胞あたり3.3 pg（全脂質の12%）にまで増加した。

Cp4株では70%のリシノール酸が低極性のトリグリセリド（TAG）画分に検出されたことから、その脂質の構造をLC-MS/MSで決定したところ、リシノール酸の水酸基に他の脂肪酸が結合したエストライド構造をもつトリグリセリド（エストライドTAG）であった。培地中にリシノール酸メチルを添加した場合にも、細胞に取り込まれたリシノール酸はエストライドTAGに変換されていた。分裂酵母ではリシノール酸の水酸基が細胞毒性を示すとされていたが、ツノケイソウでは水酸基を持つリシノール酸をエストライドTAGに変換することで、分子内の水酸基を他の脂肪酸でマスクし、細胞毒性を回避していると考えられた。

＜文献＞ [1]Kajikawa M. et al. *Sci. Rep.* 6 : 36809 (2016), doi:10.1038/srep36809

diatom, lipid metabolism, molecular breeding

発表責任者：福澤秀哉（fukuzawa@lif.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3J31p15
講演日時：3 月 19 日 17:50～ J 校舎 31 会場

PaIspS を用いた光合成藻類によるイソプレン生産の試み
Production of isoprene by photosynthetic algae using PaIspS

○浅野 卓也[1]、杉山 暁史[1]、伊福 健太郎[2]、奥村 智憲[3]、梶川 昌孝[2]、福澤 秀哉[2]、矢崎 一史[1] ([1]京都大学生存圏研究所、[2]京都大学大学院生命科学研究科、[3]大阪府立環境農林水産総合研究所)
○ Takuya Asano[1], Akifumi Sugiyama[1], Kentaro Ifuku[2], Tomonori Okumura[3], Masataka Kajikawa[2], Hideya Fukuzawa[2], Kazufumi Yazaki[1] ([1]Research Institute for Sustainable Humanosphere, Kyoto Univ., [2]Graduate School of Biostudies, Kyoto univ., [3]Research Institute of Environment, Agriculture and Fisheries, Osaka Pref.)

【背景、目的】
イソプレンは合成ゴムなどの原料として世界で 100 万トンレベルで利用されているが、その供給は全て化石資源に依存にしており、将来を見据えて持続的なイソプレン生産が求められている。一方、植物にはイソプレンを大量に放出されるものがあり、我々は従前にポプラ属植物 *Populus alba* からイソプレン合成酵素（PaIspS）遺伝子を単離しており、これを用いたイソプレン生産に取り組んでいる。藻類はバイオエタノールやバイオディーゼルの生産にも利用されており、石油代替燃料プラントも稼働するなど、有用物質生産の実用化の例が多く報告されている。そこで、*PaIspS* 遺伝子を用いて、珪藻類のツノケイソウ（*Chaetoceros gracilis*）及び緑藻類のクラミドモナス（*Chlamydomonas reinhardtii*）におけるイソプレン生産を試みた。
【方法、結果】
クラミドモナスの形質転換体は、葉緑体ゲノムに最適化した IspS の配列を PsaA プロモータおよび tufA プロモータに連結した発現プラスミドをジーンガンにより導入して作製したが、イソプレン生産は認められなかった。抗 IspS 抗体を用いたウエスタン解析において IspS の発現が検出されなかったことから、IspS タンパク質が安定的に発現されずイソプレンが生産されなかったと考えられる。
ツノケイソウではイソプレン合成酵素遺伝子の発現のため、3 種類のコンストラクトを作成した。L4fPaIS（PaIspS に集光タンパク質 Lhcf4 のプロモーターを付加）、L4P31PaIS（L4fPaIS のトランジットペプチドを Psb31 由来に置換）、NRPOPaIS（PaIspS に硝酸還元酵素のプロモーターを付加、トランジットペプチドを PsbO 由来に置換）の 3 種のコンストラクトを用いて、多重矩形波パルスエレクトロポレーション法によりツノケイソウに *PaIspS* を導入した。形質転換体の確認は、ゲノム PCR 法、RT-PCR 法、及び、抗イソプレン合成酵素抗体を用いたウエスタン解析により行った。形質転換体におけるイソプレン生産量は、IMK 培地にて菌体培養し、気相を採取管に通して揮発性成分を吸着させた後、GC/FID を用いて定量した。NRPOPaIS を使用した珪藻株で最も多くのイソプレンの生産が確認され、100 ml 培地あたり最大 30 ng のイソプレンを生産することができた。

Isoprene Synthase, Cheatoceros gracilis, Chlamydomonas reinhardtii

講演番号：3J31p16
講演日時：3 月 19 日 18:05～ J 校舎 31 会場

ORANGE 遺伝子過剰発現の *Chlamydomonas reinhardtii* カロテノイド生産への影響
Effect of ORANGE gene overexpression on carotenoid production in *Chlamydomonas reinhardtii*
森川 盾毅、三田 将平、浦口 裕介、中川 聡、○澤山 茂樹（京大農）
Tateki Morikawa, Syohei Sanda, Yuusuke Uraguchi, Satoshi Nakagawa, ○Shigeki Sawayama (Kyoto Univ.)

【背景・目的】　微細緑藻は、サプリメント原料を生産する資源生物として利用されている。特に *Haematococcus pluvialis* は機能性物質として注目されているアスタキサンチンを、*Dunaliella salina* はβカロテンを生産・蓄積することが知られている。微細緑藻を原料により経済性の高いサプリメント生産を目的に、ジンクフィンガードメインを持つフィトエン合成酵素の制御遺伝子に着目して分子育種研究を行った。微細緑藻のカロテノイド合成は、非メバロン酸経路を経由した後、フィトエン合成酵素が合成系制御に重要な働きをしていると考えられている。

【材料と方法】　*Arabidopsis thaliana* の ORANGE(OR)遺伝子のアミノ酸配列をクエリーに、モデル緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* のゲノムデータベースについて Blast 検索を行った。最も相同性の高い CPL6(Cre06.g279500)を候補遺伝子として増幅用プライマーを設計し、*C. reinhardtii* の全 RNA から逆転写後 PCR 増幅した。プライマーに制限酵素部位を付加し、*C. reinhardtii* タンパク質高発現ベクターpChlamy_4 にライゲートした。構築したベクターpChlamy-CPL6 を、*C. reinhardtii* (Matagne302 株) にガラスビーズ法で形質転換した。出現したゼオシン耐性コロニーについて、コロニーPCR でベクターの挿入を確認した。得られた形質転換体を培養後、カロテノイドをクロロホルム・メタノールにより抽出し、HPLC でスタンダートと比較して定量した。

【結果と考察】　形質転換実験の結果、ゼオシン耐性コロニーが 2 個得られ、インサートを確認したところ形質転換体 Cr-OR-1 が得られた。培養実験の結果、２つの形質転換株は野生株に比べ同等な増殖が認められた。TAP 培地で培養したところ、Cr-OR-1 の細胞当たりのβカロテン含量は野生株に比べ 1.7 倍、ルテイン含量は 1.9 倍であった。*C. reinhardtii* の CPL6 遺伝子を *C. reinhardtii* において過剰発現させると、細胞当たりのカロテノイド含量が増加することが示唆された。OR タンパクは DnaJ-like シャペロンと考えられており、*A. thaliana* においてフィトエン合成酵素を転写後に制御していると推定されている。今回はモデル微細緑藻で実験を行ったが、今後はカロテノイド合成能が高い資源微細緑藻について、同様の分子育種研究を行う予定である。

Carotenoid, ORANGE gene, *Chlamydomonas reinhardtii*

発表責任者：澤山茂樹（sawayama@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3J32a02
講演日時：3 月 19 日 09:35～ J 校舎 32 会場

担子菌エンドファイトによって誘導される宿主植物の根系発達に関する研究
Studies on the root development induced by the infection of an endophytic fungus *Piriformospora indica*
○石本 真弓、稲次 葵、吉川 凌香、岡澤 敦司、小川 拓水、太田 大策（大阪府大　生命環境）
○Mayumi ISHIMOTO, Aoi INAJI, Ryoka YOSHIKAWA, Atsushi OkAZAWA, Takumi OGAWA, Daisaku OHTA (Osaka prefecture Univ.)

植物と根圏微生物叢の間には多様な相互作用が存在する。植物は病原体の侵入に対して多様な防御応答反応を示す．植物共生微生物であるエンドファイトとの互恵的相互作用の確立初期過程においても防御応答が惹起されると考えられるが，その後に植物側で発動されるはずの抵抗性制御に関する分子メカニズムに対する明確な説明はない．本研究では、エンドファイト感染によって惹起されるシロイヌナズナの応答反応を解析し，エンドファイトとの共生関係成立過程の解明を目的とした．

担子菌エンドファイトの一種 *Piriformospora indica* は単子葉作物を含む様々な植物種と共生関係を成立させ，耐病性の増強，生育促進や収量増加などの有用な効果をもたらすことが知られている．*P. indica* はシロイヌナズナに対しても生育促進や病害抵抗性を誘導する．

まず，*P. indica* 感染によって，シロイヌナズナの主要な抗菌物質（ファイトアレキシン）カマレキシン生合成の誘導を正に制御する転写因子 *ANAC042* の発現とカマレキシン高蓄積を確認した．*P. indica* 感染は，*DR5:GUS* の著しい発現とともに，根系発達を誘導した．両者をナイロンメンブレンで隔離培養した場合にもシロイヌナズナの応答が観察されたことから，根系発達誘導には低分子化合物が関与すると推察された．本研究では，共生関係成立時に産生され，根系の発達を誘導する未知の生理活性因子の同定と構造決定を目的とした．*P. indica* とシロイヌナズナを非接触条件下で 4 日間共培養した後，液体培地を回収しフィルター滅菌によって調製した共培養液中には，根系発達と *DR5:GUS* 発現，オーキシン生合成遺伝子発現を誘導する低分子成分が含まれることが確認された．これまでに，共培養液の分離・分画によって，シロイヌナズナの側根と主根それぞれの発達誘導に関わる複数成分が存在することを確認した．

*Piriformospora indica*, auxin biosynthesis, root development

講演番号：3J32a03
講演日時：3 月 19 日 09:50～ J 校舎 32 会場

担子菌エンドファイト *Piriformospora indica* 共生によるシロイヌナズナの側根原基誘導
Induction of lateral root primordiua in Arabidopsis during the interaction with an endophytic fungus *Piriformospora indica*
○吉川 凌香、石本 真弓、稲次 葵、岡澤 敦司、小川 拓水、太田 大策（大阪府大 生命環境）
○Ryoka YOSHIKAWA, Mayumi ISHIMOTO, Aoi INAJI, Atsushi OKAZAWA, Takumi OGAWA, Daisaku Ohta (Osaka Prefecture Univ.)

植物と内生共生菌の互恵関係成立の最も初期の段階では，まず宿主植物側の防御応答が誘導されるとともに，発生・発達プログラムが改変され生育促進に至ると考えられる。本研究では，シロイヌナズナと担子菌エンドファイト *Piriformospora indica* の共生関係をモデル実験系とし，特に Trp を前駆体とする二次代謝経路に着目して，内生菌共生による生育促進の分子機構解明を目的とした。シロイヌナズナではオーキシン（IAA）に加え，防御物質ファイトアレキシン（インドールグルコシノレート，カマレキシン）が Trp を前駆体として生合成される。これまでに，*P. indica* 感染初期には，カマレキシン生合成を正に制御する転写調節因子 *ANAC042* の発現とカマレキシンの蓄積が誘導されること，オーキシンレベルのマーカーである *DR5:GUS* の発現とともに側根数が顕著に増加すること， *P. indica* とシロイヌナズナの共培養液中には，根系発達とともに側根原基で *DR5rev:GFP* の発現を誘導する未知の因子が存在することを明らかにしてきた。共培養液中には根系発達を誘導するレベルの IAA は検出されなかったことから，*P. indica* の共生によって内生 IAA 生合成が側根原基特異的に誘導され，その結果として根系発達に至ると考えられる。

シロイヌナズナにおける IAA 生合成には複数の経路が存在する。TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE of ARABIDOPSIS 1 (TAA1) と YUCCA の 2 段階の反応で IAA を産生する主経路（IPA 経路）に加え， *CYP79B2/B3* によって生成する indole-acetaldoxime（IAOx）を中間体とする経路，さらに tryptamine，あるいは indole-3-acetamide を経由する経路の関与も想定される。*P. indica* 感染によって誘導される IAA 合成経路を特定するため，*CYP79B2/B3* の二重変異系統，IAOx を基質とする *CYP71A12/13* の二重変異系統を供試し，TAA1 および YUCCA の酵素反応阻害剤処理が，内生 IAA 量（*DR5rev:GFP*）および側根原基誘導に与える影響を調べた。*CYP79B2/B3* の二重変異系統, *CYP71A12/A13* の二重変異系統, TAA1 阻害剤処理では側根原基誘導の阻害は認められなかったが，YUCCA 阻害剤処理は顕著に側根原基誘導を阻害した。これらの結果から，TAA1 非依存的に YUCCA の基質を供給する経路が存在することが示唆された。

*Piriformospora indica*, induction of lateral root primordiua, auxin biosynthesis

講演番号：3J32a04
講演日時：3 月 19 日 10:05～ J 校舎 32 会場

糖シグナリングによる側枝形成制御の分子機構
Molecular mechanisms regulating shoot branching by sugar signals
○大鳥 久美[1,2]、田部 記章[1,2]、田茂井 政宏[1,2]、重岡 成[1,2]（[1]近畿大・農・バイオ、[2]JST,CREST）
○Kumi Otori[1,2], Noriaki Tanabe[1,2], Masahiro Tamoi[1,2], Shigeru Shigeoka[1,2] ([1]Kindai Univ., [2]JST,CREST)

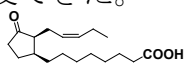
【目的】植物の枝分かれは、最終的な収量を左右する非常に重要な要素である。シロイヌナズナにおいて、側枝形成は種々の植物ホルモンや *TCP* 転写因子ファミリー（*TCP18/BRC1*）によって統合的に制御されると考えられているが、その詳細については明らかにされていない。これまでに、ショ糖生合成系の律速因子である細胞質型 FBPase を強化した形質転換タバコは、高 $CO_2$ 環境下において側枝数が野生株より増加することを明らかにした（*Photosynth Res.* 2011）。同様に、細胞質型 FBPase を導入した形質転換シロイヌナズナも高 $CO_2$ 環境下において側枝数が増加し、ショ糖とヘキソース量の増加と共に、オーキシン、ストリゴラクトン関連遺伝子および *BRC1* 遺伝子の発現量が減少していた。これらの結果は、ソース・シンクにおける糖バランスの変化が植物ホルモン関連遺伝子の発現を制御し、*BRC1* を介した茎数の増加につながることを示唆していた。実際に、通常 $CO_2$ 環境下で栽培した野生株へのショ糖・ヘキソース処理によっても、これらの遺伝子発現が影響を受けた。そこで本研究では、*BRC1* を介した側枝形成を制御する糖シグナリング因子の探索および機能解析を試みた。
【方法と結果】これまでに、糖トランスポーター1（STP1）、ヘキソキナーゼ 1（HXK1）、細胞壁インベルターゼ 6（CWINV6）、糖トランスポーター13（STP13）など、多くの糖シグナリングに関連する因子が植物ホルモンと関わることが明らかにされている。そこで、これら糖シグナリング関連因子の遺伝子破壊シロイヌナズナ株（*stp1-1, hxk1-1, cw-inv6, stp13*） を、通常 $CO_2$ 環境下で 4 週間水耕栽培し、グルコースおよびフルクトースを各 50 mM ずつ含む水耕液で 24 時間処理後の植物体の基部から mRNA を単離し、*BRC1* 遺伝子発現量を解析した。その結果、野生株で見られる糖処理による発現抑制が、*stp1-1* では見られなかった。これは *STP1* が *BRC1* 遺伝子発現を制御する糖シグナリング因子の一つであることを示唆するものであった。そこで次に、糖シグナリング機構における *STP1* の役割を明らかにするために、STP1 の過剰発現株（*stp1-ox*）を作出し、表現型を解析した。通常 $CO_2$ 環境下で 4 週間水耕栽培した結果、野生株と比較して *stp1-1* 株では生育促進および地上部乾燥重量の増加が見られたのに対し、*stp1-ox* 株では生育抑制および地上部乾燥重量の減少が見られた。今後、糖センサーを含めた糖シグナリングに関わる他の因子の探索および機能解析を行い、側枝形成を制御する糖シグナリング全体の解明を試みる。

branching, plant hormone, sugar signaling

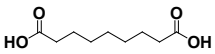
講演番号：3J32a05
講演日時：3 月 19 日 10:20～ J 校舎 32 会場

酵母細胞壁が誘導する植物の病害応答機構の解明
Plant disease responses are induced by treatment of yeast cell wall
○矢口 賢臣、高橋 公咲、松浦 英幸（北大農院）
○ Takaomi YAGUCHI, Kosaku TAKAHASHI, Hideyuki MATSUURA (Research faculty of Agriculture, Hokkaido Univ.)

**[背景]**
安心安全な農産物の供給は重要な課題であり、天然由来の素材を用いた農作物の健全育成技術が検討されている。過去に酵母から調製した細胞壁資材の葉面散布はイチゴうどんこ病を抑制すると報告されており、この資材は食品由来のバイプロダクトを用いる点や植物が本来持っている病害に対する抵抗力を引き出す点で秀でた技術と考えられる。しかし、その作用機序の詳細は明らかでない。本研究では上記の生物活性を示した細胞壁資材を用い、病害抵抗誘導に関与すると考えられるアゼライン酸の菌感染防除能の評価を目的とした。
**[方法]**
検定試料として酵母から細胞壁を抽出し、得られた細胞壁を可溶化した資材を 5 g/L 水溶液とした溶液を用いた。33 日間生育後の *Arabidopsis thaliana* の WT、もしくはアゼライン酸シグナルが不全な変異体(*azi1*)の葉面に水(Control)もしくは検定試料を十分量噴霧した。WT, *azi1* それぞれにおいて各処理 2 日後に，病害応答に関連する代謝産物量を比較した。目的化合物の分析は LC-MS/MS を用い、重水素ラベル物質を用いた内部標準法によって定量した。また，各処理 2 日後に *Botrytis cinerea* をそれぞれ接種し，感染率，病斑の大きさを調査した。今後は，*aos* や *dad* 等の変異体を用いて試験する予定である。
**[結果]**
WT では酵母細胞壁水溶液(YCW)処理によって、12-oxophytodienoic acid (OPDA)、azelaic acid (AzA)が有意に増加した。一方，*azi1* では AzA は有意な増加をしたものの、OPDA の増加は確認されなかった。AZA は全身獲得抵抗性(SAR)のプライミング物質であり、病原の再度の襲来に対しての迅速な応答に必要な生理活性物質である。本実験より、酵母細胞壁処理による OPDA の蓄積には AzA シグナル経路が必要であると想定でき、AzA シグナル経路とジャスモン酸経路との相互作用が示唆された。また、水もしくは YCW を処理した WT に *Botrytis cinerea* を感染させると、YCW 処理によって病徴が軽微となった。YCW を処理した WT と *azi1* を比較した結果，*azi1* は WT よりも病斑が大きく、感染葉が萎れることが確認された。YCW 処理は菌感染防除に有効であり、その応答機構には AzA が関与していると強く示唆できた。



12-oxophytodienoic acid



azelaic acid

yeast cell wall, azelaic acid, plant disease response

発表責任者：矢口　賢臣（t_yaguchi@eis.hokudai.ac.jp）

講演番号：3J32a06
講演日時：3 月 19 日 10:45～ J 校舎 32 会場

# シロイヌナズナ内生新規活性アシルポリアミンの探索、機能解析

# Identification and characterization of the acylated polyamine in *Arabidopsis thaliana*

○和田 隆之介[1]、山野 博之[1]、岩川 純也[1]、山岸 卓矢[1]、彦坂 政志[1]、中村 英光[1]、森 昌樹[2]、浅見 忠男[1] ([1]東大院農生科・応生化、[2]農研機構・生物機能利用研究部門)
○Ryunosuke WADA[1], Hiroyuki YAMANO[1], Jyunya IWAKAWA[1], Takuya YAMAGISHI[1], Masashi HIKOSAKA[1], Hidemitsu NAKAMURA[1], Masaki MORI[2], Tadao ASAMI[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo, [2]Institute of Agrobiological Sciences, NARO)

## 背景・目的

*Spotted leaf 18*(*Sp118*)変異体は一定の生育ステージになると自発的に疑似病斑を生成する変異体である。*Sp118* 変異体の原因遺伝子である *OsAT1* 遺伝子を過剰発現させたイネでは *Sp118* 変異体と同様に疑似病斑を形成し、病害抵抗性を示す。*OsAT1* 遺伝子はアシルトランスフェラーゼをコードすることから、*OsAT1* 過剰発現体中にはアシル化化合物が蓄積されていると考え *OsAT1* 過剰発現体イネの解析を行った結果、ポリアミンの一種であるスペルミジン(Spd)の誘導体が蓄積されていた。我々の研究グループによる誘導体合成と LC-MS/MS を組み合わせた構造解析を行った結果、これらの化合物は $N^4$-(10-hydroxylauroyl)-spermidine(4N 10HydLau)と $N^4$-(11-hydroxylauroyl)-spermidine(4N 11HydLau)というアシルポリアミンであることが明らかとなった。

ポリアミン類は植物において老化やストレス応答など幅広い生理作用に関わっていることが知られている。一方でヘキサノイル化されたスペルミジンの誘導体が老化とともにエンドウにおいて蓄積されることが報告されている。さらに我々の研究グループが構造決定した 4N 10HydLau、4N 11HydLau を投与したイネでは、イネいもち病菌などに対する抵抗性が高まると同時に、病害抵抗性に関わるファイトアレキシンの生産が誘導された。これらのことからアシルポリアミンは植物において何らかの生理作用を持っていることが期待できる。しかし機能に関する報告例は無い。そこでアシルポリアミンの機能、作用機序解明を目的とし、シロイヌナズナ内生アシルポリアミンの探索・機能解析を行った。

## 方法・結果

シロイヌナズナをメタノールで抽出後、LC-MS/MS 分析に供し内生アシルポリアミン解析を行った。その結果、すでに報告されているフェニルプロパノイド（クマル酸やフェルラ酸など）が結合したアシルポリアミンに加え、新たに数種類の脂肪酸とのアシルポリアミンが内生していることを確認した。さらにシロイヌナズナを部位別に LC-MS/MS に供し内生アシルポリアミンの局在解析を行った。さらに、4N 10HydLau をリード化合物として数種類のアシルポリアミン、4N 10HydLau ミミックを合成しシロイヌナズナにおけるカマレキシン生産誘導活性評価を行い従来のアシルポリアミンより高活性な化合物を見出した。

Acylated polyamine, Fatty acid, Camalexin

講演番号：3J32a07
講演日時：3 月 19 日 11:00～ J 校舎 32 会場

アブシジン酸に着目した根寄生雑草ストライガの寄生戦略の解析
Analysis of the parasitic strategies of the root parasitic weed *Striga hermonthica* that focuses on abscisic acid
○藤岡 聖、井上 知恵、鮫島 啓彰、水谷 正治、杉本 幸裕（神大院農）
○ Hijiri FUJIOKA, Tomoe INOUE, Hiroaki SAMEJIMA, Masaharu MIZUTANI, Yukihiro SUGIMOTO (Grad. Sch. Agric. Sci., Kobe Univ.)

【背景】ストライガ(*Striga hermonthica*)はイネ科作物を宿主とする根寄生植物である。ストライガの寄生は宿主の収量を大きく低下させるため、アフリカの半乾燥地域の作物生産を阻害する深刻な要因となっている。ストライガは盛んに蒸散することで宿主の養水分を収奪すると考えられている。一方でストライガが地表に出現する以前から宿主の生育不良が認められる。本研究グループが野外で行った先行研究においてストライガは土壌の乾燥に対する気孔の応答が鈍く、またアブシジン酸（ABA）を多く蓄積していた。本研究ではまずストライガの気孔と種子の ABA 感受性について検証を行った。さらにストライガの寄生によるソルガムの生育不良について ABA に着目した解析を行った。
【方法・結果】(1) ストライガの気孔と種子の ABA 感受性を検証した。ストライガの ABA 蓄積量は宿主であるソルガムと比較して 10 倍高かった。一方で蒸散量を示す気孔コンダクタンスはソルガムと比較して約 10 倍高く、内生量を超える ABA を処理しても低下しなかった。ストライガの種子は GR24 で発芽誘導する際に併せて ABA を処理しても発芽率が低下しなかった。(2) ストライガに含まれる ABA 量を測定した。ストライガの寄生個体の ABA 量は寄生開始 1 週目から 4 週目まで宿主より高い濃度を維持していた。宿主に依存しないストライガの地上部培養個体は寄生個体に匹敵する量の ABA を蓄積していた。ストライガの種子の ABA 量は膨潤する過程で変化しなかったが、GR24 処理により発芽を誘導すると約 10 倍に増加した。またストライガの発芽種子は蓄積量の約 4 倍量の ABA を分泌していた。(3) ストライガの寄生による宿主の生長と蒸散へ及ぼす影響について解析した。ストライガの発芽種子をソルガムの根に接種した結果、接種後 8 日目からソルガムの草丈が有意に低下した。また気孔コンダクタンスは接種後 2 日目から有意に低下した。ABA を含む水耕液中でソルガムを栽培した結果、1 μM の ABA を与えた場合にソルガムの草丈と気孔コンダクタンスの有意な低下が認められた。
【考察】 種子発芽と気孔が ABA に対して応答しなかったことから、ストライガは ABA 感受性を持たないことが考えられる。またストライガの発芽に伴って ABA が分泌されたことから、寄生に伴い ABA が宿主の根へ影響を与えることが示唆される。ABA は植物の病害抵抗反応を抑制することが報告されている。また宿主の気孔コンダクタンスの低下によってストライガの養水分の収奪が加速することが予想される。以上のことから ABA がストライガの寄生関係の確立と維持に関わるケミカルツールとして機能している可能性が考えられる。

*Striga hermonthica*, Abscisic acid, Parasitic plant

講演番号：3J32a08
講演日時：3 月 19 日 11:15～ J 校舎 32 会場

インゲン未熟種子中のアブシジン酸および 12-オキソフィトジエン酸の脱離エレクトロスプレーイオン化-イメージング質量分析法による可視化
Visualization of abscisic acid and 12-oxo-phytodienoic acid in *Phaseolus vulgaris* L. immature seeds using desorption electrospray ionization imaging mass spectrometry

○扇子 拓也[1]、佐藤 圭[2]、佐藤 太[3]、湯本 絵美[1]、宮本 皓司[1]、横田 孝雄[1]、山根 久和[1,2]、榎元 廣文[1,2] ([1]帝京大理工、[2]帝京大院理工、[3]日本ウォーターズ株式会社)
○Takuya SENSU[1], Kei SATO[2], Futoshi SATO[3], Emi YUMOTO[1], Koji MIYAMOTO[1], Takao YOKOTA[1], Hisakazu YAMANE[1,2], Hirofumi ENOMOTO[1,2] ([1]Dept. Biosci., Teikyo Univ., [2]Div. Integr. Sci. Eng., Teikyo Univ., [3]Waters Co., Ltd.)

【背景と目的】アブシシン酸(ABA)および 12-オキソフィトジエン酸(OPDA)は植物ホルモンの一種であり、種子の発達、休眠および発芽を制御している。しかし、ABA および OPDA の可視化法は確立されていない。イメージング質量分析法(IMS)は、生体分子の可視化に有効な方法である。脱離エレクトロスプレーイオン化(DESI)は、従来のマトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)に必須な試料のマトリックス処理が不要なため、低分子代謝物の検出に適している。また、四重極-飛行時間型質量分析計(Q-TOF)は検出感度および質量分解能とも高く、さらに、タンデム質量分析(MS/MS)による高精度な分析が可能である。そこで本研究では、植物ホルモンの内生量が比較的高いインゲン未熟種子を材料として用い、ABA および OPDA の DESI-IMS Q-TOF による可視化を目的とした。
【方法】インゲン未熟種子をカルボキシメチルセルロース(CMC)で凍結包埋後、クライオスタットを用いて厚さ 20μm の切片を作成し、スライドガラスに接着させた。続いて、DESI-IMS Q-TOF を用いてネガティブイオンモード、および質量分解能 30,000 で測定した。なお、溶媒には 95%メタノールを用いた。マススペクトルの画像化および化学式計算は解析ソフトを用いて行った。
【結果と考察】CMC 凍結包埋によって、本来の構造を保ったインゲン未熟種子切片が作成できた。ABA および OPDA 標準品の DESI-MS を行ったところ、それぞれ$[M-H]^-$イオンとして *m/z* 263.129 および 291.197 のピークが検出された。種子切片の DESI-IMS を行ったところ、ABA および OPDA 標準品の *m/z* 値および化学式と一致するピークが検出された。次に、ABA および OPDA のフラグメントイオンを確認するため、標準品の$[M-H]^-$イオンをプレカーサーイオンとして DESI-MS/MS を行ったところ、ABA で *m/z* 153.086 および 219.128、OPDA で *m/z* 165.25、247.201 および 273.178 のピークが検出された。種子切片の DESI-イメージング MS/MS を行ったところ、ABA および OPDA 標準品で検出されたフラグメントイオンの *m/z* 値および化学式と一致するピークが全て検出された。さらに、ABA および OPDA とも、フラグメントイオンの画像はプレカーサーイオンのものと一致していた。インゲン未熟種子において、ABA は主に胚の小根や子葉に分布しているのに対し、ほとんどの OPDA は臍や種皮といった外側に局在していた。なお、DESI-IMS の結果は、液体クロマトグラフ-MS/MS により確認された。以上の結果から、DESI-IMS Q-TOF はインゲン未熟種子中の ABA および OPDA の可視化に有効な方法であることが示唆された。
【謝辞】本研究は私立大学戦略的研究基盤形成事業の支援を受けて行われた(S131052A01)。

Plant hormone, Imaging mass spectrometry, Seed

発表責任者：榎元　廣文（enomoto@nasu.bio.teikyo-u.ac.jp）

講演番号：3J32a09
講演日時：3 月 19 日 11:30～ J 校舎 32 会場

アブシジン酸受容体アンタゴニスト PANMe の強力な抗 ABA 活性とその構造基盤
Structural basis for the biological activity of a designed ABA receptor antagonist PANMe

○三村 尚毅[1]、朝比奈 尚紀[2]、川島 徳晃[2]、岡本 昌憲[3]、須恵 雅之[4]、矢嶋 俊介[5]、大西 利幸[6]、轟 泰司[6] ([1]静大院・創造、[2]静大院・総科技・農、[3]鳥取大・乾燥地研究センター、[4]東農大・生応化、[5]東農大・バイオ、[6]静大・農)
○Naoki Mimura[1], Naoki Asahina[2], Noriaki Kawashima[2], Masanori Okamoto[3], Masayuki Sue[4], Shunsuke Yajima[5], Toshiyuki Ohnishi[6], Yasushi Todoroki[6] ([1]Grad. School Sci. Technol., Shizuoka Univ., [2]Dept. Agric., Shizuoka Univ., [3]ALRC, Tottori Univ., [4]Dept. Appl. Biol. Chem., Tokyo Univ. of Agr., [5]Dept. Bioscience, Tokyo Univ. of Agr., [6]Fac. Agric., Shizuoka Univ.)

アブシジン酸（ABA）受容体 PYR1/PYL/RCAR（PYL）は，ABA と結合して活性型配座に変化し，プロテインホスファターゼ 2C（PP2C）と三者複合体を形成してその活性を阻害することで，ABA 応答に繋がるリン酸化カスケードを活性化する。演者らは最近，PP2C の Trp 側鎖インドール基が PYL の Phe 側鎖フェニル基とπ–π相互作用しつつ，同時に ABA と水分子を介して間接的な水素結合を形成して三者複合体を安定化していることに注目し，PYL と強く結合するが PYL と PP2C の結合を妨害する化合物，PYL アンタゴニスト 4′-*O*-tolylpropynyl-ABA（PANMe）を開発した。PANMe は，ABA および既知の PYL アンタゴニスト AS6（Takeuchi *et al.*, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 477-482）よりも 10 倍強く PYL と結合してこれを阻害し，ABA によるシロイヌナズナ種子発芽阻害および実生生育阻害を強く抑制した。本研究では，PANMe の強力な PYL アンタゴニスト活性の構造基盤，分子基盤および生物活性の種間差を明らかにするために，（１）PYR1-PANMe 複合体の結晶構造解析，（２）ABA 応答性遺伝子の発現抑制効果，（３）シロイヌナズナ以外の植物種に対する生物活性について調査した。

（１）PYR1-PANNMe 複合体の共結晶は，結合様式がわずかに異なる二量体として得られた。いずれの複合体においても PANMe の ABA 骨格部分は ABA と同様に PYR1 と結合しており，PYR1 を活性型配座に変化させていた。PANMe の 4′-*O*-tolylpropynyl 側鎖部分に関しては，一方の複合体ではその電子密度を観測できなかったが，もう一方の複合体ではやや不完全ながらも観測でき，PYL-PP2C 間相互作用を妨害する位置にあった。C4′-O 結合の回転におけるエネルギー障壁が小さく，配座自由度が高いために，電子密度が不明瞭になったと考えられる。

（２）PANMe は ABA 応答性遺伝子発現を AS6 よりも強く抑制し，GUS 染色アッセイでも同様に抗 ABA 活性を示した。このことから PANMe は ABA 応答性遺伝子発現の抑制を介して ABA の生物活性を抑制することが示唆された。

（３）PANMe の抗 ABA 活性は，コマツナ，レタス，セロリ，およびミツバに対してはシロイヌナズナと同様に観測されたが，ニンジンとイネでは観測されなかった。PANMe とは構造の異なる AS6 でも同様の傾向が見られたことから，PANMe の抗 ABA 活性の種間差は，PYL オルソログ間の構造的差異には起因していない可能性が高い。

abscisic acid receptor antagonist, structure-based drug design, crystal structure analysis

発表責任者：轟　泰司（todoroki.yasushi@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3J32p02
講演日時：3 月 19 日 14:15～ J 校舎 32 会場

植物新規アシルスペルミジン類の探索・機能解析
Identification and characterization of acylated polyamines in plants
○山野 博之[1]、高橋 郁夫[1]、岩川 純也[1]、彦坂 政志[1]、中村 英光[1]、森 昌樹[2]、浅見 忠男[1]([1]東大院農生科・応生化、[2]農業生物資源研究所)
○ Hiroyuki Yamano[1], Ikuo Takahashi[1], Junya Iwakawa[1], Masashi Hikosaka[1], Hidemitsu Nakamura[1], Masaki Mori[2], Tadao Asami[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo, [2]Institute of Agrobiological Sciences, NARO)

背景・目的

イネアクチベーションタギングラインから見出された *Spotted leaf 18 (Sp118)* は、一定の生育ステージになると自発的に疑似病斑を生成するラインであり、この Sp118 の原因遺伝子であるアシルトランスフェラーゼをコードする *OsAT1* 遺伝子を過剰発現させたイネでは、*Sp118* と同じ疑似病斑を生成する。予備試験において *OsAT1* 過剰発現体中にポリアミンの一種であるスペルミジン(Spd)の数種類の誘導体が蓄積することを確認したので、想定誘導体合成と LC-MS/MS 分析を組み合わせることでそれらの構造解析を行った。その結果、N4-(10-hydroxylauroyl)-spermidine (4N10HydLau)と N4-(11-hydroxylauroyl)spermidine (4N11HydLau)という 2 種のアシル化スペルミジンを同定できた。

ポリアミン類が広く植物の生理現象、特にストレス応答に関与していることが知られている。一方、アシル化スペルミジンの植物内での役割はわかっていないが、これらがポリアミン類の役割の一部を担っている可能性がある。また我々のグループではアシル化スペルミジンとして構造推定した 4N10HydLau と 4N11HydLau を処理したイネ中で病害抵抗性が誘導されることを見出している。そこでアシルスペルミジン類機能解析の一環として、アシルスペルミジン類の存在状況を植物種と化学種を広げて調べる事にした。

方法・結果

各種条件にて生育した植物体をメタノール抽出後、LC-MS/MS 分析に供した結果、アシル化されたスペルミジンおよびプトレシンを多数検出した。スペルミジン 4 位がアシル化されたアシルポリアミンは、イネやミナトカモジグサといった単子葉類でしか見られず、1,8 位がアシル化されたアシルポリアミンは単子葉類、双子葉類のどちらでも見られた。大腸菌で *OsAT1* を発現させると、大腸菌内においてスペルミジン 4 位がアシル化されたアシルポリアミン類が蓄積した。現在、アシルポリアミンの機能解析のため、双子葉類であるシロイヌナズナやタバコにおける *OsAT1* 過剰発現株を作出しており、今後解析を進めていく予定である。

polyamine, elicitor, spermidine

発表責任者：山野　博之（yamano.pgr1@gmail.com）

講演番号：3J32p03
講演日時：3 月 19 日 14:30～ J 校舎 32 会場

シロイヌナズナにおけるサイトカイニンシグナリングによる二次成長制御機構の解析
Regulatory mechanism of secondary growth by cytokinin signaling in *Arabidopsis thaliana*.
○今村 美友[1]、島田 由里菜[1]、光田 展隆[2,3]、高木 優[2,4]、山篠 貴史[1] ([1]名大院生命農、[2]産総研生物プロセス、[3]埼玉大院理工、[4]埼玉大環境科学研究セ)
○Miyu IMAMURA[1], Yurina SHIMADA[1], Nobutaka MITSUDA[2,3], Masaru OHME-TAKAGI[2,4], Takafumi YAMASHINO[1] ([1]Grad. Sch. Bio. Sci., Nagoya Univ., [2]Bio. Res. Inst., Nat. Inst. of Adv. Ind. Sci. Tech, [3]Grad. Sch. Sci. Eng., Saitama Univ., [4]Inst. Env. Sci. Tech., Saitama Univ.)

草本、木本の違いによらず単子葉を除く多くの種子植物に観察される二次成長は、軸性器官に存在する前形成層と内鞘細胞が分裂活性を獲得してそれぞれ維管束形成層とコルク形成層として機能することにより体軸が中央-周辺軸方向へ肥厚する成長様式である。モデル高等植物シロイヌナズナでは草本植物に典型的な二次成長が観察されることが知られている。近年、cyclin D-cyclin-dependent kinase (CYCD-CDK)のサブユニットをコードする *CYCD3;1* や AP2/EREBP ファミリーに属する転写因子をコードする *AINTEGUMENTA* (*ANT*)が、細胞分裂を活性化する生理作用を示す植物ホルモンとして知られるサイトカイニンシグナルに応答して二次成長の活性化を調節していることが報告されている。また、維管束形成層の分裂や維持に関わるホメオボックスタンパク質をコードする *WOX4, WOX14* もサイトカイニン情報伝達系の下流で二次成長の活性化に関わっていることが推定されている。サイトカイニン情報伝達系が欠損した *arr1 arr10 arr12* 三重変異体においては本来細胞分裂活性が備わるべき前形成層と内鞘細胞の細胞分裂が活性化されないために二次成長が誘導されないことから、サイトカイニンは二次成長の活性化に必須の役割を果たしていると考えられる。サイトカイニンシグナルは His-Asp リン酸リレー系を介して伝達されていることが報告されているが、その下流の情報伝達に関しては不明な点が多い。そこで、本研究では軸性器官としてシロイヌナズナの根において観察される肥厚成長を解析の対象とし、サイトカイニン情報伝達系の下流で機能する制御因子を同定することを試みた。*t*-zeatin 処理 1 時間後の根のマイクロアレイ実験によるトランスクリプトームデータベースを利用して外因性のサイトカイニンに対する応答性を示す遺伝子群と、サイトカイニン生合成系の酵素をコードする遺伝子 *ipt3 ipt5 ipt7* 三重変異体を利用して内生のサイトカイニン含量が低下した植物体の根において発現低下が認められる遺伝子群をそれぞれ見いだし、その両者に属する遺伝子のうち、サイトカイニン受容体からリン酸転移を受けて活性化する Response Regulator の直接のターゲットを絞り込むために、エピトープタグ付き ARR12 を発現する形質転換体を用いたクロマチン免疫沈降実験を行い、ARR12 直下流の CK 応答性遺伝子の同定を試みた。本大会では候補遺伝子の同定、および候補遺伝子の発現部位や機能欠損変異体の表現型から二次成長を調節する役割を担っていることが推定された遺伝子の機能に関して報告する。

secondary growth, cytokinin, *Arabidopsis thaliana*.

発表責任者：山篠 貴史（yamasino@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3J32p04
講演日時：3 月 19 日 14:45～ J 校舎 32 会場

イネのファイトアレキシン生産におけるサイトカイニンの生理機能
Biological functions of cytokinin in phytoalexin production in rice
○石塚 祐伸[1]、宮本 皓司[1]、篠崎 征喜[1]、平山 琢朗[1]、本江 匡[1]、酒澤 智子[1]、湯本 絵美[1]、柴田 恭美[1]、横田 孝雄[1]、朝比奈 雅志[1]、飯野 盛利[2]、岡田 憲典[3]、山根 久和[1]([1]帝京大・バイオ、[2]大阪市大・理・植物園、[3]東大・生物工学セ)
○Masanobu ISHITSUKA[1], Koji MIYAMOTO[1], Masaki SHINOZAKI[1], Takuro HIRAYAMA[1], Tadashi MOTOE[1], Tomoko SAKAZAWA[1], Emi YUMOTO[1], Kyomi SHIBATA[1], Takao YOKOTA[1], Masashi ASAHINA[1], Moritoshi IINO[2], Kazunori OKADA[3], Hisakazu YAMANE[1] ([1]Dept. of Biosci., Teikyo Univ., [2]Botanical Gardens, Osaka City Univ., [3]Biotechnol. Res. Ctr., The Univ. of Tokyo)

イネにおける代表的な病害応答の１つに抗菌性二次代謝産物であるファイトアレキシン生産が挙げられる。イネにおいては、主要なファイトアレキシンとしてジテルペン型のモミラクトン類・ファイトカサン類、フラボノイド型のサクラネチンが同定されている。イネのストレス誘導性のファイトアレキシン生産はジャスモン酸(JA)を介したシグナル伝達によって制御されていると考えられてきたが、最近、我々は JA 欠損変異体である *cpm2* を用いることにより、ジテルペン型ファイトアレキシン生産に関しては JA を介さないシグナル伝達によっても誘導されることを明らかにした。また、我々は先行研究でサイトカイニン(CK)がイネ葉身において、ジテルペン型ファイトアレキシンを誘導することを示している (Ko et al. 2010)。さらに、Jiang et al. (2013)は、いもち病菌接種したイネにおいて CK 蓄積量が増加することを報告しており、イネの JA を介さないシグナル伝達においては、CK が二次シグナル因子として機能している可能性が考えられる。そこで、本研究では、この仮説を検証することとし、WT 及び *cpm2* イネ葉身に対して病原菌接種と同様にファイトアレキシン生産を誘導する $CuCl_2$(1 mM)処理を行い、LC-MS/MS 法により CK 蓄積量の経時変化を分析した。その結果、CK 蓄積量は WT、*cpm2* 共に処理開始後 8 h から増加し始め 24-72 h で極大を示し、主要 CK はイソペンテニルアデニン(IP)であることが示された。また、IP は WT 及び *cpm2* において 1～200 μM の範囲で濃度依存的にジテルペン型ファイトアレキシンの蓄積量を増加させることが確認され、JA を介さないシグナル伝達において CK が二次シグナル物質として機能していることが強く示唆された。現在、CK がジテルペン型ファイトアレキシン生産に関与していることをより直接的に示すためゲノム編集によるイネの CK 欠損変異株の作製を行っている。一方、$CuCl_2$ 処理した *cpm2* においては、CK 蓄積量が WT と比較して約 5 倍に増強されていることから、CK 生産に JA シグナルが関与することが示唆された。そこで、逆に CK シグナルが JA シグナル伝達に関与する可能性について検討するため、JA を介したシグナル伝達系により制御されているサクラネチン生産に及ぼす CK の影響を調べた。その結果、100 μM IP は、WT における $CuCl_2$ 処理によるサクラネチンの蓄積を抑制することが示され、ファイトアレキシン生産における JA と CK の密接な関係が浮き彫りになってきた。

**参考文献**

Ko et al., *Journal of Pesticide Science*, 35(4):412-418 (2010)
Jiang et al., *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(3):287-296 (2013)

Rice, Phytoalexin, Cytokinin

発表責任者：宮本皓司（miyamoto@nasu.bio.teikyo-u.ac.jp）

講演番号：3J32p05
講演日時：3 月 19 日 15:00～ J 校舎 32 会場

イネのジャスモン酸誘導性転写因子 RERJ1 によるリナロール生産制御メカニズムの解明
The jasmonate-inducible transcriptional factor RERJ1 regulates the linalool emission in rice
○茂手木 敦史[1]、宮本 皓司[1,2]、山根 久和[2]、新屋 友規[3]、ガリス イバン[3]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1] ([1]東京大学大学院生物生産工学研究センター、[2]帝京大学理工学部バイオサイエンス学科、[3]岡山大学資源植物科学研究所)
○Atsushi MOTEGI[1], Kouji MIYAMOTO[1,2], Hisakazu YAMANE[2], Tomonori SHINYA[3], Ivan GALIS[3], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Teikyo Univ., [3]Okayama Univ.)

【背景と目的】ジャスモン酸は、植物が虫害・傷害などのストレスに応答して誘導的に生産される植物ホルモンであり、防御応答や成長制御など植物の様々な生理応答に関与している。我々は、イネにおいてジャスモン酸処理後 15 分で早期に発現誘導を受ける遺伝子として bHLH 型転写因子をコードする *RERJ1*（*Rice Early Responsive to Jasmonate 1*）を単離し、ジャスモン酸シグナル伝達における RERJ1 の生理的な役割の解明を進めている。これまでに *RERJ1* のゲノム配列への *Tos17* の挿入により、*RERJ1* の転写量が著しく低下した *rerj1-Tos17* 挿入変異株（以下 *rerj1* 変異株）を用いた解析を行い、傷害処理時のマイクロアレイ解析の結果より昆虫忌避作用を示すモノテルペン化合物リナロールの生合成酵素遺伝子（*OsLIS*）をはじめ、Proteinase Inhibitor など複数の虫害抵抗関連遺伝子の発現量が *RERJ1* の欠損により減少することを明らかにしている。そこで本研究では、*rerj1* 変異株におけるリナロール生産量の物質レベルでの解析と共に、*OsLIS* プロモーターに対する RERJ1 の転写活性化能を検討することで、RERJ1 によるリナロール生産制御メカニズムの解明を目指す。
【方法と結果】リナロールを含むイネの揮発性成分の生産に対し RERJ1 が与える影響について定量的な評価をするため、イネ植物体から放出される揮発性物質を捕集し GC-MS による分析を行った。野生型株および *rerj1* 変異株の最大展開（n）葉と n-1 葉に対し、均一に傷がつくようルレットを用いて傷害処理を与え、処理後の植物体をアクリル製の揮発性物質捕集装置内に設置し、気相に含まれる揮発性物質を、PorapakQ カラムを用いて 24 時間継続的に回収し GC-MS 分析に供した。その結果、ピネンやカリオフィレンを含む主要な揮発性テルペノイドや緑の香り（Green leaf volatiles）については *rerj1* 変異株と野生型株の間で有意な変化は認められなかったのに対し、*rerj1* 変異株におけるリナロールの生産量は野生型株に比べ大きく低下していた。この結果から、RERJ1 は虫害応答時の揮発性物質の生産において、リナロール生産を正に制御していることが示唆された。また、*OsLIS* プロモーターに対する RERJ1 の転写活性化能を評価するため、ホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に *OsLIS* プロモーターを挿入したレポータープラスミドと *UBQ* プロモーター下で *RERJ1* を発現させるエフェクタープラスミドをイネ葉身にパーティクルガンで導入し、レポータージーンアッセイを行った。その結果、*OsLIS* 翻訳開始点上流 540bp を用いた場合に、RERJ1 による *OsLIS* の転写活性化能が認められた。現在、RERJ1 による *OsLIS* 発現活性化に重要なシスエレメントの同定を目指して、さらに deletion より領域を絞り込んだプロモーター解析を進めている。

JA, Rice, Linalool

発表責任者：茂手木敦史（mottya51659-atsu@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3J32p06
講演日時：3 月 19 日 15:25～ J 校舎 32 会場

ハイゴケにおける化学防御物質モミラクトン生合成制御機構の解明
Regulation mechanism for the biosynthesis of chemical defense substances momilactones in the moss Hypnum plumaeforme
○照屋 美優[1]、藤原 薫[1]、宮本 皓司[2]、新屋 友規[3]、Galis Ivan[3]、山根 久和[2]、林 謙一郎[4]、野尻秀昭[1]、岡田 憲典[1] ([1]東大・生物工学セ、[2]帝京大・バイオ、[3]岡山大・植物研、[4]岡山理科大・理学部)
○Miyu TERUYA[1], Kaoru FUJIWARA[1], Koji MIYAMOTO[2], Tomonori SHINYA[3], Ivan GALIS[3], Hisakazu YAMANE[2], Ken-ichiro HAYASHI[4], Hideaki NOJIRI[1], Kazunori OKADA[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Teikyo Univ., [3]Okayama Univ., [4]Okayama Univ. of Science)

【背景・目的】イネが生産するジテルペン型ファイトアレキシンのモミラクトンは、植物に耐病性やアレロパシー活性などの競争力を与える化学防御物質である。イネ以外には、蘚類ハイゴケがアレロパシー物質としてモミラクトンを生産する。モミラクトンの生産は病原菌の感染や塩化銅暴露など様々なストレスで誘導されるが、その過程で働く二次的なシグナルとして、植物の病害応答を制御するジャスモン酸の関与が明らかになっている。最近我々は、ハイゴケのモミラクトン生合成に必要なピマラジエン合成酵素遺伝子 *HpDTC1* の発現が、ジャスモン酸処理では誘導されず、その前駆体であるオキソフィトジエン酸（OPDA）処理によって誘導されることを見出した。蘚類のモデルであるヒメツリガネゴケでは OPDA による防御応答遺伝子の発現変動が報告されており、コケ類では高等植物とは異なるオキシリピンシグナルの存在が予想される。本研究では、ハイゴケのオキシリピンシグナルに着目しつつ、*HpDTC1* の発現誘導を指標にモミラクトン生産制御機構の解析を進めている。
【手法・結果】まず、ハイゴケにおけるオキシリピン測定を行った。ハイゴケにおいては、塩化銅処理によるモミラクトン生産誘導と *HpDTC1* の転写誘導が示されているので、塩化銅処理した植物体のメタノール抽出物をカラム精製後 LC-MSMS 分析に供した。その結果、ジャスモン酸の蓄積は認められなかったが、OPDA の蓄積が認められた。このことから、ハイゴケにおいてもジャスモン酸ではなく、OPDA がオキシリピンシグナル物質として働いている可能性が示唆された。最近、OPDA のアミノ酸複合体の存在が高等植物において報告されたことから、ハイゴケについても OPDA-Ile などのアミノ酸複合体が存在するのかどうかを現在解析している。次に、*HpDTC1* プロモーター領域の解析のため、ハイゴケにおけるパーティクルガンを用いたレポーターアッセイ系の構築を進めた。デュアルルシフェラーゼアッセイによる活性評価のため、*Renilla luciferase*を恒常的に発現するプロモーターとして、カリフラワーモザイクウイルス由来 35S プロモーターおよびトウモロコシユビキチンプロモーター（UBQ promoter）を検討したところ、UBQ promoter でより高い転写活性を確認した。また遺伝子導入には、ハイゴケ培養用 BCDATG 培地に継代後約 1 ヶ月の植物体を使用し、3 μg のプラスミドを形質導入することで十分な活性が得られることがわかった。現在、*HpDTC1* プロモーター約 3.4 kb に GUS レポーターを連結したプラスミドを用いたアッセイを進めており、化学合成した OPDA-Ile などを含むオキシリピンを処理した場合の *HpDTC1* プロモーターのレスポンスについても検討し、その誘導性に必要なシス・トランス因子の特定を進めていく。

chemical defense, phytoalexin, oxylipin

講演番号：3J32p07
講演日時：3 月 19 日 15:40～ J 校舎 32 会場

菌の脂肪酸代謝物（BMFA）による植物病害抑制効果などの植物応答へのアプローチ（1）
Approach of Plant Responses to Plant Disease Control by Bacterial Metabolites of Fatty Acid (BMFA) (1)
○大野 勝也（イビデン）
○Katsuya OHNO (IBIDEN)

収量を確保する農業から差別化できる付加価値を高めた農業へ、作物が本来持つ機能を高めることで作物栽培環境の観点からの永続可能な農業こそがグローバル市場にとっても重要となってくると我々は考えている。その一つが IPM と呼ばれる作物の管理技術であると言える。これまで、病原菌に直接作用する農薬が主流であった。そのような中でも 30 年前から注目されている抵抗性誘導剤は耐性菌もないとされている。それは、植物自体の免疫システムに作用していることに起因する。植物抵抗性誘導のメカニズムとしては、サリチル酸経路とジャスモン酸/エチレン経路が明らかとなっている。サリチル酸系抵抗性誘導剤はプロペナゾールにはじまり、アシベンゾラル S メチル(ASM)やイソチアニル、チアヂニルなどがある。その他、植物の病原体に対するエリシター認識反応を利用した酵母やカビ、細菌などの細胞膜や細胞壁成分などを対象とした抵抗性誘導の報告もある。これまでにタンパク質の植物体内の誘導抵抗性に関する研究は深められてきているが、脂肪酸に着目した研究はほとんどない。我々は偶然発見したプロテオバクテリアに属する一部の菌による脂肪酸代謝産物（以下 BMFA：Bacterial Metabolites of Fatty Acid とする）が植物の機能性や免疫性を高めることで病害抑制等に間接的に寄与する可能性を見出した。予めペプトン等で培養した菌体を窒素飢餓の状態にして脂肪酸のみを基質にして培養すると脂肪酸を出発材料に種々の酸化物が生成されて、それが植物にとって抵抗性を発現する刺激や抵抗性誘導におけるアクセスしやすい材料となっているのではないかと考えている。2016 年のドイツベルリンで開催された IOBC-WPRS WG Biological and Integrated Control of Plant Pathogens にて一部既に報告したが、さらに新たな知見が得られたので、本学会では 1)ポット試験～圃場試験における結果と 2)遺伝子発現の結果、3)メカニズムについて 3 部構成にて各演者が報告する。

Fatty Acid, Plant Disease Control, Induced Systemic Resistance

発表責任者：大野勝也（katsuya_ono@ibiden.com）

講演番号：3J32p08
講演日時：3 月 19 日 15:55～ J 校舎 32 会場

# 菌の脂肪酸代謝物（BMFA）による植物病害抑制効果などの植物応答へのアプローチ（2）

# Approach of Plant Responses to Plant Disease Control by Bacterial Metabolites of Fatty Acid (BMFA) (2)

○高田 久美子、横田 晃章、野原 偏弘、大野 勝也（イビデン株式会社）
○Kumiko TAKADA, Teruaki YOKOTA, Tomohiro NOHARA, Katsuya ONO (IBIDEN CO., LTD)

抵抗性誘導剤は通常病原体には直接作用せず、植物体の防御機構を活性化することによって病害に対する抵抗性を高めるものである。その作用機構から、耐性菌が出現する可能性が低く、長期利用可能な薬剤として価値が高い。これまでにリノレン酸など脂肪酸を原料にして抵抗性誘導を発現させるジャスモン酸などが植物体内で生合成されることは広く知られている。しかしながら、脂肪酸が微生物代謝によって酸化された物質に抵抗性誘導があることは知られていない。また、これまでに見つかっている抵抗性誘導剤や酸化脂質等は水へ極めて難溶であり、強力な乳化剤や分散剤等が必要であった。我々は微生物にリノール酸を基質として与え、水溶性の代謝産物を得ることに成功し、この代謝産物の植物病害に対する抵抗性、生育促進効果を検証した。
キュウリ本葉 3 葉期の本葉に代謝産物を噴霧し、24 時間後に灰色カビ病菌を摂取し 4 日間発病を観察した。結果、代謝産物を処理したものは無処理のものより病斑形成が抑えられた。トマト根に代謝産物を処理し 24 時間後に青枯れ病菌 *Ralstonia solananceurum* を摂取した結果、代謝産物を処理したものは、無処理区より発病が抑えられた。さらにトマトを青枯れ病圃場にて栽培したところ、代謝産物処理したものは無処理のものより青枯れ病の発病が遅延した。また、ナスを同圃場にて栽培したところ、収穫果数、良果率とも無処理より高かった。また根重は無処理と比較して 1.6 倍であった。また、シロイヌナズナの根に代謝産物を処理し、24 時間後に軟腐病菌を摂取し 4 日後に病徴を観察したところ、代謝産物を処理したものは無処理よりも発病が抑えられた。
これらの結果より、リノール酸の微生物による代謝産物は、灰色カビ病、トマト青枯れ病抑制効果、ナス生育促進効果があることが示唆された。また、シロイヌナズナ根に処理し葉に軟腐病菌を摂取した場合にも抑制効果が見られたことから、抵抗性誘導による病害抑制効果が発現したと推察された。

Bacterial Metabolites of Fatty Acid, Plant Disease Control, Inducing Disease Resistance

発表責任者：大野勝也（katsuya_ono@ibiden.com）

講演番号：3J32p09
講演日時：3 月 19 日 16:10～ J 校舎 32 会場

菌の脂肪酸代謝物（BMFA）による植物病害抑制効果などの植物応答へのアプローチ（3）
Approach of Plant Responses to Plant Disease Control by Bacterial Metabolites of Fatty Acid (BMFA) (3)
○横田 晃章、大野 勝也、高田 久美子、野原 偏弘（イビデン株式会社）
○ Teruaki YOKOTA, Katsuya OHNO, Kumiko TAKADA, Tomohiro NOHARA (IBIDEN CO.,LDT.)

植物抵抗性誘導剤として、プロベナゾール、アシベンゾラル S メチル、チアニジル、イソチアニジル、酵母抽出液などが報告されている。しかしながら、脂質由来の抵抗性誘導剤は広く知れ渡っていない。今回、我々は特定の微生物を用いて、天然脂肪酸である脂肪酸の代謝産物（以下、BMFA）を得た。この BMFA を植物の根に処理したところ、トマトで青枯れ病が、シロイヌナズナで軟腐病が顕著に抑制された。このことから、BMFA が直接病原菌を抑制するのではなく、植物自体の抵抗性誘導を引き起こしていることが示唆された。そこで、抵抗性誘導が起こった場合で、発現量が増加することが報告されている遺伝子についてリアルタイム PCR を用いたΔΔCt 解析を行った。トマトについてはサリチル酸系の抵抗性遺伝子として *PR1a*、ジャスモン酸系の抵抗性遺伝子として *LoxD* を指標とした。シロイヌナズナについても同様に *PR1* と *PR2* をサリチル酸系抵抗性遺伝子とし、*PDF1.2* をジャスモン酸系抵抗性遺伝子として用いた。

トマト葉の遺伝子発現解析の結果、BMFA を処理したものでは、水のみを処理したものに比べて *PR1a* で 6 倍、*LoxD* で 4 倍まで発現量が増加していた。既存の抵抗性誘導剤であるプロゼナゾール処理したものが *PR1a* で水のみ処理したものの 2 倍の発現量増加を示したことからも、BMFA は、非常に高い抵抗性誘導を示すことが明らかになった。また、シロイヌナズナ葉の遺伝子発現解析の結果も、同様に *PR1* で 2 倍、*PR2* で 10 倍の発現量増加を示し、*PDF1.2* でも 8 倍の発現量増加が観察された。既存の抵抗性誘導剤で、これほどの抵抗性遺伝子発現量を示すものは無かった。

以上の結果より、BMFA が植物に対して、非常に高い抵抗性誘導を示すことが明らかになった。また、興味深いことに BMFA では、サリチル酸系とジャスモン酸系の両方の抵抗性誘導が起こっていた。これは既知の抵抗性誘導剤では謳われていない現象である。現在、BMFA がどう変化し、サリチル酸・ジャスモン酸の抵抗性誘導を引き起こしているのかを物質レベルで解析を行っている。

induced systemic resistanse, fatty acids, *Arabidopsis thaliana*

発表責任者：大野　勝也（katsuya_ono@ibiden.com）

講演番号：3J32p10
講演日時：3 月 19 日 16:25～ J 校舎 32 会場

# 菌の脂肪酸代謝物（BMFA）による植物病害抑制効果などの植物応答へのアプローチ（4）

# Approach of Plant Responses to Plant Disease Control by Bacterial Metabolites of Fatty Acid (BMFA) (4)

○野原 偏弘（イビデン株式会社）
○Tomohiro NOHARA (IBIDEN CO.,LTD.)

植物の病害抵抗性にはサリチル酸経路とジャスモン酸経路による抵抗性誘導機構が存在し、それぞれ病傷害より生成するエリシター物質との応答メカニズムがあるとされている。抵抗性誘導物質としては、これまでにサリチル酸類縁体やジャスモン酸やエチレンなどのホルモン、短鎖揮発性物質や、カビ等が細胞壁に持つβグルカンなどが報告されている。一般にこのような細胞の応答反応は細胞表面の受容タンパクが、エリシターの特異な構造を認識、結合することにより開始されることが多い。また、特異な構造とはβグルカンに見られる糖鎖、タンパク、ペプチドなどがもつ結合様式や電荷の多彩さにより成されることが多い。

これらのうち、植物における抵抗性誘導機構の応答物質を利用して、植物の病害に対する抵抗性を向上させる農薬や農業資材が存在している。近年問題になっている抵抗性病害などが発生しにくく、残留農薬などの危険性が少ない植物栽培方法として今後の食料生産などで非常に意義がある。

我々のグループでは、これまでに難分解性物質や脂質類の微生物分解研究を行ってきた過程で、菌による脂肪酸代謝物（BMFA）により植物病害抵抗性誘起効果を発見した。この現象に関連し、微生物反応による代謝メカニズム及び、植物の応答メカニズムを推定し、植物育成用の抵抗性薬剤としての効果について評価した結果を報告する。特に代謝産物の推定とそれぞれの作用との相関について報告する。

fatty acid, metabolites, resistance

発表責任者：大野勝也（katsuya_ono@ibiden.com）

講演番号：3J32p11
講演日時：3 月 19 日 16:50～ J 校舎 32 会場

CE オンライン濃縮法を用いた植物粘質物質(Mucilage)中のアニオン分析
Anion analysis of root mucilage by CE using on-line preconcentration method
○東 良太[1]、藤井 紳一郎[2]、安保 充[1] ([1]明治大・農、[2]産総研・物質計測)
○Ryota Azuma[1], Shin-ichiro Fujii[2], Mitsuru Abo[1] ([1]Meiji Univ., [2]AIST)

**【背景目的】**

植物は多様な栽培環境に適応するために、炭水化物、アミノ酸、有機酸、フェノール性酸、脂肪酸、ステロール類、酵素など、さまざま種類の有機化合物を含有する植物性粘液(ムシラージ; Mucilage)を分泌することがわかっている。ムシラージの機能は、根冠を土壌との物理的抵抗から保護すること、水分と栄養調節を行うことと考えられているが、その中に含まれるとされる有機酸やアミノ酸によって、根と病原菌との相互作用、根圏微生物との共生などの役割が示唆された報告もあり、その役割は詳しくは理解されていない[1)]。本研究では、キャピラリー電気泳動装置を使用することにより、植物体から直接回収したムシラージを、オンライン濃縮法を用いて直接分析し、アニオン性化合物の検出を試みた。

**【方法・結果】**

ムシラージの採取

ムシラージサンプルは、アルミニウムストレスによって根から有機酸分泌が増加する植物として知られるトウモロコシ(*Zea mays*)から採取した。具体的には、トウモロコシの種子をシャーレに播種し 3 から 4 日間培養を行った。その後、1 mM 塩化カルシウムを含んだコントロールの試験区と、さらに 100 μM 塩化アルミニウムを含んだストレス試験区へと移植した。移植後 24 時間後のトウモロコシ根からムシラージを試料として採取した。

キャピラリー電気泳動分析

ムシラージに含まれることが予想されるアニオン性化合物（シュウ酸、クエン酸、リンゴ酸、カフェ酸、シリンガ酸、サリチル酸、安息香酸、バニリン酸、*p*-クマル酸）を標準物質として用いて分析を行った。分析にはキャピラリー電気泳動装置(P/ACE MDQ ； BECKMAN COULTER)、フューズドシリカキャピラリー（ジーエルサイエンス)、検出にはフォトダイオードアレイ検出器を使用した。泳動液は Lin らの報告[2)]を参考に、リーディングイオンとして 120 mM リン酸ナトリウムバッファー（pH 2.8:±175 mM SDS)、ターミナルイオンとして 30 mM ホウ酸バッファー(pH 8.6)を作製した。サンプルの注入方法は、サンプルをターミナルイオンに溶かし、100 倍希釈したものを電気的注入法によりキャピラリーに注入し、CE オンライン濃縮法による分析を行った。有機酸標準液とムシラージの分析を行った結果、複数のアニオン性化合物由来のピークが得られた。

【引用文献】

1) Vranova *et al., Plant Nutr.,* 176: 175-199 (2013).
2) Lin *et al., Anal. Bioanal. Chem.,* 407: 7093-7100 (2015).

Root mucilage, On-line preconcentration method, Capillary electrophoresis (CE)

発表責任者：安保 充（abo@meiji.ac.jp）

講演番号：3J32p12
講演日時：3 月 19 日 17:05～ J 校舎 32 会場

グルタチオンによる孔辺細胞アブシシン酸シグナル伝達制御機構の解明
Regulation of guard cell abscisic acid signaling by glutathione
○宗正 晋太郎、長橋 大樹、横井 隆志、中村 宜督、村田 芳行（岡山大院・環境生命）
○Shintaro MUNEMASA, Hiroki NAGAHASHI, Takashi YOKOI, Yoshimasa NAKAMURA, Yoshiyuki MURATA (Okayama Univ. Graduate School of Environmental and Life Science.)

高等植物の葉の表皮に存在する気孔は、一対の孔辺細胞から成る小孔であり、光合成に必要な二酸化炭素の取込みや蒸散による水分放出の調節を行う場所である。アブシジン酸は、乾燥ストレスに応答して生合成される植物ホルモンであり、気孔閉口を誘導することで蒸散による過度の水分損失が抑制する働きを持つ。孔辺細胞でのアブシジン酸シグナル伝達は、アブシジン酸受容体である PYR/PYL/RCAR、脱リン酸化酵素 PP2C、そしてタンパク質リン酸化酵素 OST1 をコアとしたシグナル伝達系が過去に報告されている。グルタチオンは、細胞内の酸化還元恒常性の制御に関与する重要な分子である。近年我々の研究グループは、(1)孔辺細胞内のグルタチオン量がアブシジン酸誘導気孔閉口に伴い減少すること、(2)孔辺細胞内グルタチオン量の減少が気孔閉口を制御するアブシジン酸シグナル伝達を強めること、を明らかにした。今回、我々は、モデル植物であるシロイヌナズナを用いて、アブシジン酸による孔辺細胞グルタチオン量制御機構及び、グルタチオンによる孔辺細胞アブシジン酸シグナル伝達制御機構について得られた分子レベルでの知見を報告する。

guard cell, abscisic acid, glutathione

講演番号：3J32p13
講演日時：3 月 19 日 17:20～ J 校舎 32 会場

デハイドリンの凍結保護活性における K セグメントの疎水性アミノ酸の役割
The role of hydrophobic amino acids of K-segment in cryoprotective activity of dehydrin
○神谷 慶太[1]、遠藤 拓弥[1]、亀山 阿由子[1]、原 正和[1,2] ([1]静岡大農、[2]静岡大グリーン研)
○Keita Kamiya[1], Takuya Endo[1], Ayuko Kameyama[1], Masakazu Hara[1,2] ([1]Shizuoka Univ. Agric, [2]Shizuoka Univ. RIGST)

【はじめに】デハイドリンは、植物において、種子の成熟後期や、低温ストレスを受けた時に発現する蛋白質である。酵素の安定化、水やイオンの結合、活性酸素種の発生抑制によって細胞を保護すると考えられているが、メカニズムの詳細は不明である。最近、当研究室では、デハイドリンの保存配列 K セグメント（典型的配列 TypK：EKKGIMEKIKEKLPG）は酵素凍結失活抑制活性を示すが、その疎水性アミノ酸 4 つのうち 2 つ以上をトレオニン（T）に置換すると活性が消失することを見出した。これは、K セグメントの疎水性アミノ酸が活性発現に関与することを示している。本研究では、TypK と、TypK の全疎水性アミノ酸を T に置換した TypK_Hphob/T（EKKGTTEKTKEKTPG）を用い、溶液中における状態変化を調査した。その結果、凍結保護作用における、K セグメントの疎水性アミノ酸の役割を推定した。
【材料と方法】TypK 及び TypK_Hphob/T は化学合成で得た。クロマトグラフィー試験では、N 末端 FITC 結合ペプチドを用いた（FITC の付加は活性に影響しない）。凍結失活試験には、リコンビナントウサギ乳酸脱水素酵素（LDH）を用いた。凍結融解は液体窒素を用いて 3 回行った。LDH 活性は、NADH の吸光度変化で決定した。LDH の凝集体形成と変性促進は、それぞれ光散乱法と疎水性蛍光プローブ（8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid）法によって調査した。ペプチドの二次構造は、円二色性（CD）スペクトル並びに各種ソフトによって解析した。
【結果と考察】LDH 溶液を凍結融解すると、著しい活性の減少、凝集体の形成、変性の促進が見られた。TypK はそのすべてを抑制したが、TypkK_Hphob/T は抑制しなかった。疎水クロマトグラフィーの結果、TypK は、TypkK_Hphob/T より疎水性相互作用をしやすいと考えられた。ゲルろ過クロマトグラフィーでは、両ペプチド共に、約 6 量体を形成していると推定された。CD 分析の結果、両ペプチドは無秩序性を示すスペクトルを与え、ペプチド無秩序性判定ソフト（IUPred）でも、同様の結果となった。ペプチド立体構造予測ソフト（PEP-FOLD）によれば、両ペプチドは、緩いヘリックス様構造を取りうるが、TypK のみ、4 つの疎水性アミノ酸が、ヘリックスの一側面に整列するという結果となった。これは、ヘリカルホイール解析ソフト（HeliQuest）の結果と一致した。以上の結果、水溶液中での TypK と TypkK_Hphob/T は、共に緩いヘリックス様の構造をとりつつ多量体化しているが、TypK は、疎水性残基を一側面に整列させ、他の分子の疎水性領域と相互作用する可能性が示された。LDH は、凍結変性する際、疎水性部分を露出すると考えられているので、TypK と LDH との疎水性相互作用が、LDH の凍結失活を抑制すると考えられる。

dehydrin, cryoprotection, lactate dehydrogenase

講演番号：3J32p14
講演日時：3 月 19 日 17:35～ J 校舎 32 会場

# イネ幼苗期の低温順化処理は低温ストレス耐性を向上させるとともに収量を増加させる
# Improvement of cold tolerance and yield by cold acclimation treatment for rice seedlings

○提箸 祥幸、佐藤 裕（農研機構・北農研）
○Yoshiyuki SAGEHASHI, Yutaka SATO (NARO Hokkaido Agr Res Cent)

熱帯起源作物であるイネは、品種改良などを経て徐々に高緯度地域でも栽培が可能になり、現在では北海道が我が国の主産地の一つを占めるまでになった。イネのような熱帯・亜熱帯を起源とする植物の多くは常温で生育させた後に低温環境下に置かれると著しい生育障害が起こり、ときには枯死に至る。その一方で、越冬作物であるムギ類などでは通常の低温応答の他に、一定期間低温に暴露されることで低温耐性を獲得する低温順化の機構が存在する。近年、イネにおいても低温順化により低温耐性を獲得する機構の存在が明らかになってきた。

幼苗期のイネを弱い低温で数日間処理（低温順化処理）すると、無処理であれば枯死してしまうような低温環境下でも生き延びることができる。これは低温順化処理によりイネ幼苗の低温ストレス耐性が向上したことを意味する。我々はこれまでに、Sucrose が低温順化処理により顕著に増加することを明らかにした。そして、Sucrose の蓄積量を指標として最適な低温順化処理条件を検討し、12℃5 日間処理が最も低温耐性の向上効果が高いことを見出した。

今年度は、北海道の食用イネ品種「おぼろづき」と飼料用品種「きたあおば」を用いて、低温順化処理が収量に与える影響について調査を行った。無処理区と 12℃5 日の低温順化処理区のそれぞれ 30 株について、稈長、穂長、分げつ数、総籾数（収量）を調査した。低温順化処理区で無処理区に対して「おぼろづき」は 1 株あたり 20%、「きたあおば」は 1 株あたり 14%の収量が増加した。「おぼろづき」では低温順化処理区で分げつ数が増加しており、「きたあおば」では低温順化処理区で稈長および穂長が伸長していた。

以上のことから、イネ幼苗に対する低温順化処理は幼苗の低温ストレス耐性を強化するだけでなく、収量の増加につながる処理方法となる可能性を示した。今後は、低温順化処理が移植後のイネの生育に与える影響について調査し、収量増加の要因について明らかにする予定である。

本研究の一部は公益財団法人農芸化学研究奨励会の支援を受けて実施した。

rice, cold acclimation, yield

発表責任者：提箸祥幸（sagehasi@affrc.go.jp）

講演番号：3J32p15
講演日時：3 月 19 日 17:50～ J 校舎 32 会場

玄米外観品質における高 $CO_2$ の影響
Effect of elevated $CO_2$ on appearance quality of rice grains
○若松 和[1]、涌井 翔太郎[1]、猪俣 拓也[1]、金古 堅太郎[1]、Baslam Marouane[2]、三ツ井 敏明[1,2]（[1]新潟大院、自然科学、[2]新潟大農、応生化）
○Nodoka WAKAMATSU[1], Shotaro WAKUI[1], Takuya INOMATA[1], Kentaro KANEKO[1], Marouane BASLAM[2], Toshiaki MITSUI[1,2] ([1]Grad. Sch. Sci & Tech, Niigata Univ., [2]Dept. Applied Biol. Chem., Niigata Univ.)

産業革命以降，人間活動による大気中への温室効果ガスの排出の増加により，地球温暖化が深刻な問題となっている．最も主要な温室効果ガスである $CO_2$ の大気中濃度は，現在の約 400ppm から今世紀末までに約 700ppm までの上昇が予想されている．一般的に，$CO_2$ 濃度の上昇は作物栽培において好条件として働く．イネにおいても，$CO_2$ 濃度の上昇により光合成が促進されて，デンプンの蓄積が増加しバイオマス及び玄米の収量が増加したことが報告されている．一方，高 $CO_2$ 環境下では，気孔が閉じられ蒸散量が減少することで，穂温が上昇するという報告もある．イネの登熟期における高温ストレスは白未熟粒を多発させることが知られているが，このような高 $CO_2$ 環境への応答は，玄米品質の高温障害を助長させる可能性が考えられる．しかし，高 $CO_2$ による玄米外観品質低下のメカニズムは，まだほとんど解明されていない．我々は，メカニズム解明の第一歩として，高 $CO_2$ によって白未熟粒が多発する時期の特定を試みている．また，高 $CO_2$ 環境下での生育調査や，発生した白未熟粒のメタボローム解析を行った．その結果，開花前の栄養成長期（開花前の約 20 日間）の高 $CO_2$ 付加によって，生育に差が見られた．メタボローム解析からは，クエン酸サイクルの後半の代謝物の増加が見られた．しかし，$CO_2$ 濃度条件のみを変化させた場合には，品質への影響が小さいことも示唆された．そこで，高 $CO_2$ に加え強光を同時に与えた，複合ストレス条件で同様の実験を行った．複合ストレス下では，対照区や高 $CO_2$ ストレスのみの場合と比較して，葉温が上昇し，成長に与える影響も大きくなることが見いだされた．

elevated $CO_2$, rice, grain quality

発表責任者：若松和（f16d040@mail.cc.niigata-u.ac.jp）

講演番号：3J32p16
講演日時：3 月 19 日 18:05～ J 校舎 32 会場

# The role of protein synthetic system in NPP1 mutant under high temperature and elevated $CO_2$ conditions

○ MAROUANE BASLAM[1], TAKUYA INOMATA[2], KENTARO KANEKO[2], NODOKA WAKAMATSU[2], TOSHIAKI MITSUI[1,2] ([1]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Niigata University, [2]Graduate School of Science and Technology, Niigata University)

Given the importance of changes in plant development for crop yield under climate change, the effects of higher $CO_2$ and temperature on starch above ambient conditions clearly merit further study. An *N*-glycosylated protein mutant in rice (*Oryza sativa* L.), nucleotide pyrophosphatase / phosphodiesterase (NPP1), displays a high starch phenotype, indicating that NPP1 negatively regulates starch metabolism and growth responses under high temperature and $CO_2$ concentration conditions. To gain further insight into the molecular mechanisms of NPP1 mutation-induced starch accumulation, quantitative iTRAQ-based proteomic analysis was used to identify differentially accumulated proteins between the NPP1 mutant and its corresponding wild-type (WT). Our findings herein revealed the stimulation of protein synthetic system in NPP1 under conditions of elevated $CO_2$ and high temperature. Our results indicate that 14-3-3 protein may play an important role in starch accumulation in rice NPP1, that it may represent a novel target controlling starch metabolism in rice plants under changing climate conditions. Mutation in NPP1 affects proteins involved in protein synthesis responses to mediate plant starch accumulation, growth and development.

Nucleotide pyrophosphatase / phosphodiesterases (NPP), Starch, 14-3-3 proteins

発表責任者：Marouane Baslam（mbaslam@gs.niigata-u.ac.jp）

講演番号：3J33a01
講演日時：3 月 19 日 09:20～ J 校舎 33 会場

# *Trichoderma reesei* 由来 Cel1A の糖転移生成物のセルラーゼ誘導活性

Cellulase induction activity of transglycosylation products by Cel1A from *Trichoderma reesei*

○戸谷 一英[1]、佐野 孝晃[1]、二階堂 望[1]、中島 将博[2]、中井 博之[3]、中澤 光[4]（[1]一関高専・物化工、[2]東理大院・理工、[3]新潟大・農、[4]東北大院・工）

○Kazuhide TOTANI[1], Takaaki SANO[1], Nozomi NIKAIDO[1], Masahiro NAKAJIMA[2], Hiroyuki NAKAI[3], Hikaru NAKAZAWA[4] ([1]Nation. Inst. Tech., Ichinoseki Coll., [2]Sci. & Tech., Tokyo Univ. Sci., [3]Facul. Agric. Niigata Univ., [4]Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ.)

【背景および目的】

糸状菌 *T. reesei* の β-glucosidase (BGL)は 10 種類の遺伝子が存在し、セルロースを炭素源とする培養では、Cel3A (BGL I)、Cel1A (BGL II)、Cel3C の 3 種が発現する。我々は菌体外へ分泌される Cel3A が β1,3-グルカナーゼ活性を有することを明らかにしている[1)]。Cel3A はセロビオース分解への寄与は低いとされるが、オリゴ糖など外因性の誘導物質の分解に関わっているかどうかは不明である。一方、菌体内に存在する Cel1A は高濃度のセロビオースや Glc から強いセルラーゼ誘導能を持つソホロース（Sop2、Glcβ1→2Glc）を生成することが知られており[2, 3)]、セルラーゼ誘導に関わっていると推測される。我々は大腸菌で発現した Cel3A や Cel1A が、糖転移反応により β-1,2 結合を含む 3 糖以上のオリゴ糖を生成することを報告し[4)]、糖転移生成物を詳細に解析することで新たなセルラーゼ誘導剤の探索を試みている。本研究では、大腸菌で発現した Cel1A を使用してセロビオースを基質とした糖転移生成物の構造解析を試みると同時にセルラーゼ誘導能を検討した。

【方法】

*T. reesei* 由来の Cel1A 遺伝子を組み込んだプラスミド pET22bs を大腸菌 Rossettagami B で発現、超音波で溶菌し、His tag 精製 Kit などにより精製した。セロビオースを基質とした糖転移反応を行い、反応生成物を重合度別に活性炭カラムクロマトで分離し、各画分を HPLC (Intakt Unison UK-Amino)でピークごとに分取して NMR による構造解析を行った。これらの糖転移生成物や構造既知のオリゴ糖（2 糖、3 糖、4 糖）を使用して *T. reesei* におけるセルラーゼ誘導試験を行った。

【結果】

Cel1A は、糖転移反応により β1→2, β1→3, β1→4 結合した 2 糖、および、還元末端に β-1,2 結合が偏った 3 糖以上のオリゴ糖を生成していた。3 糖以上の各画分にソホロースに匹敵するセルラーゼ誘導活性を見出した。各オリゴ糖のセルラーゼ誘導活性についても報告する。

1) 佐藤大輔ら、日本農芸化学会 2015 度大会要旨集 3E32a14
2) Mandels M. et al., *J. Bacteriol.* **83**(2), 400-408 (1962)
3) Saloheimo M. et al., *Appl. Environment. Microbiol.*, **68**(9), 4546-4553, (2002)
4) 応用糖質科学 6(3), Cp-14 (2016)

*Trichoderma reesei*, Cel1A, cellulase induction

講演番号：3J33a02
講演日時：3 月 19 日 09:35～ J 校舎 33 会場

# 貝類由来セルラーゼ EG27II の X 線結晶構造解析および機能解析

# X-ray crystallography and functional analysis of a snail cellulase EG27II

○野村 泰介[1]、水谷 公彦[2]、岩瀬 久夢[2]、高橋 延行[2]、三上 文三[2] ([1]京大農、[2]京大院農)
○Taisuke NOMURA[1], Kimihiko MIZUTANI[2], Hisamu IWASE[2], Nobuyuki TAKAHASHI[2], Bunzo MIKAMI[2] ([1]Faculty of Agriculture, Kyoto Univ., [2]Graduate School of Agriculture, Kyoto Univ.)

【目的】Glycoside Hydrolase Family 45（GH45）のセルラーゼ（EC 3.2.1.4；endo-1,4-β-D-glucanase）は多様な生物種から見つかっている。これらのセルラーゼは、アミノ酸配列の類似性により 3 つのサブファミリーA／B／C に分けられている。昆虫や線形動物などはサブファミリーA のセルラーゼを持ち、また貝類はサブファミリーB のセルラーゼを持つ一方、子嚢菌類はすべてのサブファミリーのものを持つことが報告されている。GH45 のセルラーゼはアノマー反転型であり、塩基触媒残基としてサブファミリーA では Asp 残基を、サブファミリーC では Asn 残基を用いていることが明らかとなっている。しかし、サブファミリーB については立体構造や触媒機構について未だ詳細な報告がない。よって、本研究ではサブファミリーB のセルロース加水分解機構を解き明かすため、巻貝 *Ampullaria crossean* 由来 EG27II の発現系構築、結晶化、X 線結晶構造解析を行った。またそこから推測される触媒残基の部位特異的変異体を作成し、その酵素化学的特性を評価した。

【方法・結果】メタノール資化性酵母である *Pichia pastoris* を用いて EG27II 発現系を構築した。C 末端に付加した His タグを利用して Ni-NTA アフィニティーカラムによる精製をおこない、結晶化スクリーニングおよび結晶化条件の最適化をおこなった。得られた結晶について、SPring-8 の BL26B1 で回折データを収集し、アポ体を 0.95 Åの高分解能で構造決定した。その立体構造から、EG27II は GH45 の特徴である six stranded double-psi β-barrel 構造をもつことが明らかとなった。さらにソーキングによりセロビオース複合体を 1.04 Åの分解能で構造決定し、セロビオースの電子密度がサブサイト-3～-2 および+1～+2 に見られた。他の GH45 セルラーゼの立体構造との比較より、酸触媒残基は Asp137 と判断され、また塩基触媒残基は Asp27 か Asn112 のどちらかと推定された。Asp27 はサブファミリーA の塩基触媒残基と、また Asn112 はサブファミリーC の塩基触媒残基と相同な残基であった。一方で、Asp27 の側鎖はサブサイト-1 ではなく-2 を向いていた。これらの触媒残基候補を Ala 残基に変えた変異体を作成し、それらのカルボキシメチルセルロース加水分解活性を測定したところ、D137A では活性がほとんど欠失していたが、D27A では WT の 3%、N112A では 1%程度の活性が残存していた。以上のように、立体構造および変異体酵素活性より、EG27II の塩基触媒残基は Asn112 と推測された。現在、変異体の酵素基質複合体の構造解析を行っている。

Cellulase, X-ray crystallography, Glycoside hydrolase family 45

発表責任者：野村泰介（nomura.taisuke.57n@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3J33a03
講演日時：3 月 19 日 09:50～ J 校舎 33 会場

*Paenibacillus* 属細菌由来細胞表層キチナーゼ ChiW の立体構造
Crystal Structure of Chitinase ChiW from *Paenibacillus* sp. str. FPU-7
○伊藤 貴文[1]、日ビ 隆雄[1]、藤井 豊[2]、武藤 明[3]、木元 久[1] ([1]福井県大・生物資源、[2]福井大・医、[3]福井工大・工)
○Takafumi ITOH[1], Takao HIBI[1], Yutaka FUJII[2], Akira TAKETO[3], Hisashi KIMOTO[1] ([1]Fukui Pref. Univ., [2]Fukui Univ., [3]Fukui Univ. Tech.)

【目的】*Paenibacillus* sp. str. FPU-7 株はキチンの分解能力に優れたグラム陽性細菌である。本細菌はキチナーゼ群を菌体外に分泌することが明らかとなっているが、キチナーゼ ChiW も同時に細胞表層に提示している[(1, 2)]。ChiW は、捕食標的の細胞壁を分解するための重要な役割を担っていることが示唆されるが、その分子機構は明らかになっていない。そこで、本酵素の立体構造解析に着手した。
【方法】ChiW は自身の細胞壁に結合するためのドメイン (SLH) と 2 つの触媒ドメインを持つ。全長での結晶化は困難であったため、SLH を欠失した酵素の結晶化を検討した。また、これまでに 2 つの触媒ドメインのみからなる酵素の立体構造を決定している[(3)]。酵素は大腸菌体中に大量に発現させた後、Ni-IMAC により精製した。結晶は 1 M リン酸アンモニウムを含む溶液から取得した。放射光実験施設 SPring-8 にて X 線回折強度データを取得し、2.1 Å 分解能で解析した。触媒ドメインのみからなる酵素の立体構造モデルを利用した分子置換法により位相を決定後、*R* 因子 17.5%で立体構造を決定した。
【結果】SLH を欠失した ChiW は 6 個のドメインから構成されていた (糖質結合モジュール 54 (CBM54) ドメイン、イムノグロブリン様ドメイン-1 (Ig-1)、GH18 ドメイン-1、イムノグロブリン様ドメイン-2、GH18 ドメイン-2)。ChiW の CBM54 ドメインは、多糖リアーゼに多く存在する右巻き β-ヘリクスフォールドを有していたが、多糖分解活性は認められず、他の CBM-54 ドメインと同様、細胞壁多糖と結合した。エンド型の作用様式を示す触媒ドメインは、深いクレフトを形成していたが、基質結合領域は短かった。一般的に不溶性のキチンを分解するキチナーゼは、キチン結合ドメインが触媒ドメインと連結し、活性部位付近に基質を濃縮するが、ChiW の場合では、クレフトに接するキチン結合ドメインは存在しなかった。

(1) Itoh, T. Hibi, T., Fujii, Y., Sugimoto, I., Fujiwara, A., Suzuki, F., Iwasaki, Y., Kim, J-K., Taketo, A. and Kimoto, H. ***Appl. Environ. Microbiol.*****,** 79, 7482–7490, 2013.
(2) Itoh, T., Sugimoto, I., Hibi, T., Suzuki, F., Matsuo, K., Fujii, Y., Taketo, A. and Kimoto, H. ***Biosci. Biotechnol. Biochem.*** 78, 624–634, 2014.
(3) Itoh, T., Hibi, T., Sugimoto, I., Suzuki, F., Fujii, Y., Taketo, A. and Kimoto, H. ***Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*** 70, 350–353, 2014.

chitinase, Paenibacillus, surface layer homology domain

発表責任者：伊藤　貴文（ito-t@fpu.ac.jp）

講演番号：3J33a04
講演日時：3 月 19 日 10:05～ J 校舎 33 会場

細菌 *Chitiniphilus shinanonensis* のキチン代謝における β-N-acetylglucosaminidase の役割について

A role of ß-N-acetylglucosaminidase in chitin metabolism of the bacterium *Chitiniphilus shinanonensis*

○小松 茜、佐藤 弘晃、田口 悟朗、野川 優洋、下坂 誠（信州大繊維）
○ Akane KOMATSU, Hiroaki SATO, Goro TAGUCHI, Masahiro NOGAWA, Makoto SHIMOSAKA (Shinshu Univ.)

【背景と目的】

本研究室で、強力なキチン分解細菌 *C. shinanonensis* SAY3 株を分離同定し、本株のキチン分解系を調査してきた(1)。既に、SAY3 株ゲノムのドラフトシークエンスを決定し、49 個のキチン分解関連酵素の候補遺伝子を見出した。この中でエキソ型の β-N-acetylglucosaminidase (NAG)をコードする遺伝子は 1 個（*chiI*）のみであった。*chiI* 遺伝子破壊株を作成したところ、野生株の 1%程度の NAG 活性を示し，キチン培地において野生株と同等の増殖速度を示したことから第 2 の NAG の存在が示唆された。本研究では，第 2 の NAG 候補遺伝子である *chi35* について，遺伝子産物の機能を調査しキチン代謝における役割を考察した。

【実験方法】

*chi35* の異種宿主発現には，大腸菌用発現ベクターpColdI を用いた。NAG 活性の測定は，合成基質 4-nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosaminide (*p*NP-GlcNAc)を用い、反応により遊離した *p*NP 量を定量した。遺伝子破壊は、グラム陰性細菌用広宿主域 suicide 型ベクターである pMo130 を用い allele exchange 法により作成した (2)。

【結果と考察】

キチン培地で培養した SAY3 株の RNAseq 分析により、β-hexosaminidase とアノテーションされた遺伝子が 1 つ検出された(*chi35* と命名)。本遺伝子産物 Chi35 を第 2 の NAG 候補として調査を行った。大腸菌宿主で発現させた組換えタンパク質 Chi35 は NAG 活性（0.40 μmol/min/mg-protein）を示したが，先に報告した第 1 の NAG である ChiI の活性（341 μmol/min/mg-protein）と比較して 0.1%程度の微弱な活性であった。Chi35 を天然基質である GlcNAc 5 量体と反応させたところ，初期に 4 量体と単量体が生成し，さらに順次低分子化したことより、Chi35 のエキソ型分解様式が確認できた。*chi35* 遺伝子の上流および下流側領域から得た各断片（約 1.0 kb）をベクターpMo130 に挿入し，大腸菌 S17.1 株を介して接合伝達により SAY3 株に導入した。SAY3 株ゲノム中の *chi35* 遺伝子領域への相同組換えによるプラスミド全体の挿入，2 回目の相同組換えによるプラスミド脱落を経て遺伝子破壊株を選抜し，実際に c*hi35* 遺伝子が欠損していることを PCR により確認した。現在、*chi35* 破壊株の NAG 活性と種々の炭素源に対する増殖速度を調査中である。

(1) Sato *et al.*, J. Gen. Appl. Microbiol., 55, 147-153 (2009) , (2) Mohamad *et al*., Gene, 430, 123-131 (2009)

chitinase, ß-N-acetylglucosaminidase, chitin

発表責任者：下坂　誠（mashimo@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3J33a05
講演日時：3 月 19 日 10:20～ J 校舎 33 会場

# *Stenotrophomonas maltophilia* NYT501 の糖転移型

# Study about transglycosylation reaction-catalyzing β-*N*-acetylhexosaminidase of *stenotrophomonas maltophilia* NYT501

○宮 弘昂[1]、高橋 愛実[1]、平野 貴子[2]、袴田 航[1,2]、西尾 俊幸[1,2]（[1]日大院生資科、[2]日大生資科）
○Hirotaka MIYA[1], Narumi TAKAHASHI[1], Takako HIRANO[2], Wataru HAKAMATA[1,2], Toshiyuki NISHIO[1,2] ([1]Graduate School of Bioresource Sciences,Nihon Univ., [2]Nihon Univ.)

[目的] キチンは *N*-アセチル-D-グルコサミン（GlcNAc）が β-1,4 結合で直鎖上に結合した高分子化合物であり、地球上ではセルロースに次いで 2 番目に多く生産されている多糖である。キチンは主にカニやエビなどの甲殻類の殻に多く含まれており、近年その利用価値が見出されてきた。キチンの分解により得られる単糖やオリゴ糖にはさまざまな生理作用があることが報告されている。キチンオリゴ糖の性質をより詳しく調べるためには、効率の良いキチンオリゴ糖の生産・精製方法の開発が必要であり、キチンオリゴ糖を生産する方法として、現在は、強酸を用いた化学分解法が用いられている。しかし、本法では特定鎖長のキチンオリゴ糖を特異的に生産することが難しいため、各鎖長のオリゴ糖の機能性についてはあまり調べられていない。そこで、生成物特異性の高い酵素法によってキチン由来オリゴ糖の生産を行うことにした。当研究室では既に、酵素法を用いてキチンから *N,N'*-diacetylchitobiose [$(GlcNAc)_2$] を大量に効率良く生産することが可能である [1]。そこで、$(GlcNAc)_2$ を基質とした糖転移反応による GlcNAc の 3 糖や 4 糖の生産を目指すことにした。これまでに土壌中から得た *Stenotrophomonas maltophilia* NYT501 が、糖転移活性酵素を生産することが分かっている。本研究では、この酵素の同定を行った。

[方法と結果] *S. maltophilia* NYT501 を培養し、菌体内と菌体外の粗酵素を回収した。これらを $(GlcNAc)_2$ に作用させたところ、菌体内粗酵素のみで糖転移活性が見られた。そこで、本菌を培養して得た菌体から粗酵素を回収し、酵素の精製を試みた。3 種類のカラムクロマトグラフィーにより得られたタンパク溶液を SDS-PAGE で調べた結果、メインのバンドが 2 本検出された。そこで、これらのタンパクの N 末端アミノ酸解析を行ったところ、一方のタンパクの N 末端アミノ酸配列は、データベース上に登録されている *S. maltophilia* の β-*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ（NAG）と一致した。また、今回得られた粗酵素を用いて $(GlcNAc)_2$ を基質とした転移反応を行った結果、3 糖や 4 糖の生産が確認できた。したがって、 NYT501 株の転移活性酵素は NAG であると推定した。さらに、本菌株のこの推定 NAG の遺伝子配列をサンガー法により解読した結果、既報の *S. maltophilia* の NAG との遺伝子配列の同一性は 90%以上、また、アミノ酸配列の同一性も 90%以上であった。以上より、目的の糖転移活性酵素は明らかに NAG であると考えられる。今後は本酵素のリコンビナント体を大腸菌で作成し、詳細な酵素化学的性質を調べる計画である。

1) Minamoto, T. *et al.*, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **175**, 3788-3799 , 2015

*Stenotrophomonas maltophilia*, β-*N*-acetylhexosaminidase, chitin oligosaccharide

講演番号：3J33a06
講演日時：3 月 19 日 10:45～ J 校舎 33 会場

*Bacillus* sp. CH11 株 N-アセチルヘキソサミニダーゼの酵素的性質
Enzymatic properties of N-acetylhexosaminidase from *Bacillus* sp. CH11.
○倉掛 昌裕、天井 裕可里、小西 瑞希、池平 佳歩（福山大生命工）
○Masahiro Kurakake, Yukari Amai, Mizuki Konishi, Kaho Ikehira (Fukuyama Univ.)

【目的】カニやエビ殻等の成分であるキチンは N-アセチルグルコサミンがβ-1,4 結合した多糖であり医療や食品等に利用されている。キチン分解酵素系の中で N-アセチルグルコサミンを遊離させる N-アセチルヘキソサミニダーゼには糖転移作用を有するものもあり、新規オリゴ糖の合成が期待できる。本研究では土壌よりキチン分解菌の分離を行い、糖転移性を有する N-アセチルヘキソサミニダーゼを生産する *Bacillus* sp. CH11 株を得た。本研究では CH11 株 N-アセチルヘキソサミニダーゼの糖転移性等の酵素的性質について調べた。
【方法】0.5%キチン（カニ由来）、0.2%酵母エキス、1.5%寒天の平板培地を用い土壌よりキチン分解菌の分離を行った。分離菌の CH11 株を 0.5%キチン、0.2%酵母エキスの液体培地 100ml（500ml 三角フラスコ）にて、130rpm、30℃で 3 日間培養し酵素の生産を行った。培養ろ液に硫酸アンモニウムを 80%飽和になるように添加・溶解し、酵素タンパク質を塩析させた。ろ過により分離した塩析物を pH7 の 50mM クエン酸-リン酸緩衝液で溶解し粗酵素溶液を調製した。ゲルろ過のセファデックス G-25 カラム（ファルマシア㈱）および陰イオン交換クロマトグラフィーのスーパーQ トヨパールカラム（東ソー㈱）により酵素精製を行った。酵素活性は 1mM *p*-ニトロフェニル-β-D-N-アセチルグルコサミニドに pH 7、40℃にて 10 分間反応させ、遊離する *p*-ニトロフェノール量を比色法で測定することで求めた。1 分間に 1μmol の *p*-ニトロフェノールを生成させる酵素量を 1U と定義した。糖転移反応では基質に 2%の N,N'-ジアセチルキトビオース（東京化成㈱）を用い、pH7、40℃で 24 時間作用させた。また 8%の受容体を加えて反応させ、各受容体への糖転移性について検討した。生成糖の分析には GL-C610 カラム（日立化成㈱）を有する HPLC（流速 1.0ml/min、キャリアー 蒸留水、カラム温度 60℃）を用いた。
【結果および考察】CH11 株 N-アセチルヘキソサミニダーゼの最適 pH は 7 付近で、最適温度は 40℃であった。当該酵素をジアセチルキトビオースに上記最適条件にて 24 時間作用させたところ、分解物の N-アセチルグルコサミンと伴に、糖転移した 3 糖のトリアセチルキトトリオーストを生成した。糖転移反応での受容体特異性では、メタノールやエタノール等のモノアルコールへの糖転移が認められたが単糖および２糖類への転移はなかった。また、3 価アルコールのグリセリンや糖アルコールのキシリトールへの糖転移性が高いとがわかった。ポリフェノール等の水酸基を有する有機酸類への糖転移性についても検討を行った。

N-acetylhexosaminidase, N-acetylglucosamine, transglycosylation

発表責任者：倉掛昌裕（kurakake@fubac.fukuyama-u.ac.jp）

講演番号：3J33a07
講演日時：3 月 19 日 11:00～ J 校舎 33 会場

*Streptomyces griseus* 由来の LPMO10 の解析
Analysis of the LPMO10s from *Streptomyces griseus*

○中川 裕子[1]、渡辺 惣汰[1]、石川 隆大[1]、Loose S. M. Jennifer[2]、竹林 晃[1]、加藤 早紀[3]、森 俊明[3]、戸谷 一英[1]、Vaaje-Kolstad Gustav[2]、Eijsink G. H. Vincent[2] ([1]一関高専　物化工、[2]Norwegian Univ. of life sci.、[3]東工大院　生命理工)
○Yuko NAKAGAWA[1], Sota WATANABE[1], Takahiro ISHIKAWA[1], Jennifer S. M. Loose[2], Hikaru TAKEBAYASHI[1], Saki KATO[3], Toshiaki MORI[3], Kazuhide TOTANI[1], Gustav Vaaje-Kolstad[2], Vincent G. H. Eijsink[2] ([1]National Institute of Technol, Ichinoseki College, [2]Norwegian Univ. of life sci., [3]Tokyo Institute of Technol.)

キチンやセルロース等の強固な多糖バイオマスを環境に負荷をかけずに分解し，利用するためには酵素分解法のみを用いることが望ましい．しかし，これらの多糖質は水に不溶で結晶性が高く，そのままでは酵素による分解効率が著しく低い．完全な酵素分解法を実現するためには，酵素自身の効率化とともに，分解促進物質の添加が有効であると考えられる．我々は，食品製造用菌株として食品添加物リストに収載されている *Streptomyces* 属由来の Lytic polysaccharide monooxigenases (LPMOs) を対象として，多糖質の酵素分解における促進効果を調べている．今回は *Sg*LPMO10C, D, F についての発表を行う．また，*Sg*LPMO10A に関しては，当研究室の里が発表する．

【研究内容】

*Streptomyces griseus* には AA10 family に属する *Sg*LPMO10 が 6 つ存在している．変異体を含む各 *Sg*LPMO10 は，*Brevibacillus* 発現系 (Takara) で組換え酵素を得た．主にキチンカラムを用いて精製した各 *Sg*LPMO10 に関して，α–及びβ–キチンを基質に用い，3 種のキチナーゼと併用したキチン分解効率の比較を行った．

*Sg*LPMO10C, D, F は 2 種の基質，及び 3 種のキチナーゼ全ての組み合わせで酵素分解効率を促進した。β-キチンから得られる主なキチン分解産物 $(GlcNAc)_2$ の量は，α–キチン由来の $(GlcNAc)_2$ の 10 倍程度であった．この結果は，LPMO の有無にかかわらず，β–キチンの分解効率がα–キチンの 10 倍程度高いことを示している。しかし，分解効率向上の点ではα–キチンで LPMO の効果が高いことがわかった．特に解析の進んでいる *Sg*LPMO10F に関して $(GlcNAc)_2$:GlcNAc の比を求めたところ，α–キチンでのみ *Sg*LPMO10F 添加時の値が高くなることがわかった．この *Sg*LPMO10F で LPMO 活性に重要とされている 56 番目のチロシン (Y) 残基は，特にα–キチンに対する効果が大きい *Sg*LPMO10C, D ではトリプトファン (W) 残基になっている．そこで，α–キチンの分解効率の向上を目指して Y56 を W に変異させた組換えタンパク，*Sg*LPMO10F Y56W を作成した．この変異組換えタンパクをオリジナルの *Sg*LPMO10F と比較すると，48 時間後のα–キチンの分解効率が向上していた．このことから，*Sg*LPMO10F の 56 番目の Y 残基は，キチンの分解において重要であることがわかった．この活性の変化の理由について，Y56 をアラニン (A) に変異させた組換えタンパク *Sg*LPMO10F Y56A の結果も交えつつ考察する。

LPMO, AA10, chitin

発表責任者：中川裕子（ynakagawa@ichinoseki.ac.jp）

講演番号：3J33a08
講演日時：3 月 19 日 11:15～ J 校舎 33 会場

*Streptomyces griseus* 由来 LPMOs，*Sg*LPMO10A の機能解析
Functional analysis of *Sg*LPMO10A, one of LPMOs from *Streptomyces griseus*
○里 和希[1]、千葉 大介[2]、戸谷 一英[1]、中川 裕子[1] ([1]一関高専　物化工、[2]北大　環境科学)
○Kazuki SATO[1], Daisuke CHIBA[2], Kazuhide TOTANI[1], Yuko NAKAGAWA[1] ([1]National Institute of Technol, Ichinoseki College, [2]Graduate School of Environmental Sci, Hokkaido Univ)

【背景・目的】
セルロース，キチンなどの多糖バイオマスは，分解することにより有用産物を生じる．環境における負荷の小さい酵素分解法を実現するためには，解決すべき課題が多数存在する．近年，酵素分解法を実現するために注目されているのが，LPMOs (Lytic Polysaccharide MonoOxigenases) と呼ばれる多糖を酸化的に切断する活性を有し，加水分解酵素の作用を促進する働きを持つ酵素である．

本研究では，*Streptomyces griseus* 由来 LPMO (*Sg*LPMOs) の 1 つである *Sg*LPMO10A のセルロース及びキチンに対する機能解析を行った．この *Sg*LPMO10A は，推定触媒部位である AA10 と糖鎖結合モジュールである CBM2 から構成されるため，*Sg*LPMO10A 全長での機能評価と CBM2 欠損型 (*Sg*LPMO10A-AA10) の機能解析を行った．

【結果】
*Sg*LPMO10A の発現量を解析した結果，炭素源としてキチンを使用した場合と比較して，セルロースを使用した場合で発現量の増加が見られた．基質に対する結合能を評価した結果，*Sg*LPMO10A はキチン及びセルロースに対して結合能を示したが，*Sg*LPMO10A-AA10 は両基質に対する結合能が低下していた．両基質に対する *Sg*LPMO10A の LPMO 活性を評価した結果，両基質に対して活性を有することが分かった．一方，*Sg*LPMO10A-AA10 はセルロースに対してのみ LPMO 活性を示した．β-キチンを基質に用い，キチナーゼと併用した際には分解促進効果は得られなかったが，セルロースを基質に用い，セルラーゼと併用した際には，分解開始後 48 時間後のグルコース生成量が SgLPMO10A 未添加の場合の 6 倍に増加した．キチンに *Sg*LPMO10A を反応させた際，部分脱アセチル化された産物が検出されることから，脱アセチル化度の異なる基質を使用して LPMO 活性を評価した結果，*Sg*LPMO10A はβ-キチンのみに活性を示し，脱アセチル化された基質には活性を示さなかった．

以上から，*Sg*LPMO10A はキチン，セルロースに対して LPMO 活性を有するが，主にセルロースに対して強く作用することが分かった．また，CBM2 は *Sg*LPMO10A において基質への結合に重要であること，キチンに対する LPMO 活性に必要なことが分かった．*Sg*LPMO10A がキチンに対して作用した際に生じる産物は，キチン上の脱アセチル化された部分由来の生成物ではなかったことから，*Sg*LPMO10A がキチンに対する脱アセチル化活性を有する可能性が示唆された．

LPMOs, AA10, polysaccharide biomass

講演番号：3J33a09
講演日時：3 月 19 日 11:30～ J 校舎 33 会場

ボルボックスキチナーゼがもつ 2 つの LysM ドメインの構造と機能
Structure and function of two LysM domains of a chitinase from Volvox carteri
○北奥 喜仁[1,2]、廣野 武[1]、西村 重徳[3]、沼田 倫征[4]、深溝 慶[1]、大沼 貴之[1]([1]近畿大学、[2]日本学術振興会特別研究員、[3]大阪府立大学、[4]産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門)
○Yoshihito KITAOKU[1,2], Takeru HIRONO[1], Shigenori NISHIMURA[3], Tomoyuki NUMATA[4], Tamo FUKAMIZO[1], Takayuki OHNUMA[1] ([1]Kindai Univ., [2]Res. Fellowship for Young Scientists of JSPS, [3]Osaka Pref. Univ., [4]Biomed. Res. Inst. AIST)

【目的】LysM（Lysin Motif）ドメインは、N-アセチルグルコサミンを含む多糖やオリゴ糖と相互作用するタンパク質において見出されるドメインである。我々はボルボックス（*Volvox carteri*）が産生するキチナーゼ（VcChi）がもつ LysM ドメインについて研究を行っている。昨年、VcChi 中のタンデムにつながった 2 つの LysM ドメインのうち、N 末端から 2 番目の LysM ドメイン(LysM2)において、二つの連続したα–ヘリックスが逆平行β–シートを形成するβ-ストランドとループでつながったβααβフォールドをとること、また、ループ領域に存在するタンパク質表面のクレフトにおいてオリゴ糖と相互作用することを報告した[1)]。本発表では、VcChi の N 末端においてタンデムにつながる二つの LysM ドメイン（LysM1 および LysM2）の構造と機能について比較を行うことを目的とした。
【方法】LysM1 および LysM2 をそれぞれ大腸菌（SHuffle T7）で発現させた。菌体破砕後、酸性のバッファーでの透析および 2 種のカラムクロマトグラフィーで精製した。精製した LysM1 および LysM2 の $(GlcNAc)_{3-6}$ に対する結合力を、ITC を用いて調べた。安定同位体（$^{13}C$ および $^{15}N$）でラベル化した LysM1 と LysM2 を上記と同様にして精製し、主鎖および側鎖に由来する NMR シグナルを 1H-15N HSQC、$^{1}H$-$^{13}C$ HSQC、HNCO、HNCACO、CBCACONH、HNCACB、HBHACBCACONH、HCCH-TOCSY、CCH-TOCSY、DQF-COSY スペクトルに基づいて、連鎖的に帰属した。リガンドとの相互作用を調べるため、キチンオリゴ糖（$(GlcNAc)_{3-6}$）を滴定し、$^{1}H$-$^{15}N$ HSQC スペクトル上のシグナルの摂動を追うことで、オリゴ糖と相互作用する残基を調べた。また、$^{15}N$-および $^{13}C$-NOESY-HSQC スペクトルを測定し、NOE、化学シフトに基づく二面角情報（TALOS）および H-D 交換実験により推定された水素結合の情報に基づいて CYANA による溶液構造計算を試みた。
【結果】LysM1 と LysM2 の $(GlcNAc)_{3-6}$ に対する結合熱を、ITC を用いて測定した結果、いずれの結合も発熱的な過程であり、結合力は LysM1 の方が高く、いずれの鎖長のオリゴ糖に対しても、結合定数で 5 倍程度の違いが見られた。安定同位体でラベル化した LysM1 と LysM2 の $^{1}H$-$^{15}N$ HSQC スペクトルを測定したところ、いずれのタンパク質でも分散した良好なクロスピークが得られた。それぞれに $(GlcNAc)_{3-6}$ を滴定したところ、ループ領域の主鎖 NH に由来するシグナルの摂動が観測された。現在、LysM1 と LysM2 の構造を解析しており、両者の結合力の差異をもたらす構造的な要因を明らかにする予定である。
1) Kitaoku *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 2016, Epub ahead of print

LysM, Chitinase, algae

講演番号：3J33a10
講演日時：3 月 19 日 11:45～ J 校舎 33 会場

新規な一次構造をもつキチナーゼの同定
Identification of a structurally novel chitinase
堀内 あゆみ [1]、ASLAM Mehwish[1]、○金井 保 [1,2]、跡見 晴幸 [1,2] ([1] 京大工、[2]CREST, JST)
Ayumi HORIUCHI[1], Mehwish ASLAM[1], ○Tamotsu KANAI[1,2], Haruyuki ATOMI[1,2] ([1]Kyoto Univ., [2]CREST, JST)

超好熱菌 *Thermococcus chitonophagus* はキチンを唯一の有機物源とする培地により単離されたアーキアである [1]。本菌は複数種のキチナーゼをもつことが予想されており [2,3]、さらに GH18 型キチナーゼの一部をコードする遺伝子断片が単離されている [4]。しかしながら本菌のキチン分解・資化システムの全貌は未解明であった。我々は本菌のキチン分解・資化に関わる遺伝子群を網羅的に同定することを目的として、本菌のドラフトゲノム解析を行った。次世代シークエンサー HiSeq 2000（イルミナ）により得られたゲノムデータ（総コンディグ数 20、総コンティグ塩基数 1,964,779 bp、予想 ORF 数 2,168）内には、GH18 型キチナーゼの遺伝子が 2 つ存在し(*Tc*-ChiA, *Tc*-ChiC)、さらに N 末端の分泌シグナルに続き、２つの chitin-binding domain (ChBD)と機能未知ドメインをもつ遺伝子が存在した（*Tc*-ChiD）。*Tc*-ChiD は ChBD をもつ分泌タンパク質であることから、細胞外でキチン分解に関与することが予想された。しかし *Tc*-ChiD の機能未知ドメインは、これまでにキチナーゼ活性が確認されているいずれの糖質加水分解酵素ファミリー（GH18/GH19/GH23/GH48）とも相同性を示さず、唯一、中温偏性嫌気性細菌 *Clostridium botulinum*（ボツヌリス菌）に広く分布する機能未知タンパク質との相同性を示した。我々は *Tc*-ChiD が構造的に新規なキチナーゼである可能性を考え、その特性解析を行った。大腸菌を用いて調製し、精製した組換え *Tc*-ChiD タンパク質を用いて、GlcNAc から$(GlcNAc)_6$までの鎖長のキチンオリゴ糖に対する加水分解活性を調べた（反応温度 85°C）。その結果、*Tc*-ChiD は$(GlcNAc)_4$ 以上の鎖長のキチンオリゴ糖に対して加水分解活性を示し、$(GlcNAc)_2$ と$(GlcNAc)_3$ を生成することが判明した。また還元末端側が *p*-ニトロフェニル基で修飾されたキチンオリゴ糖を用いた活性測定により、本酵素はキチン鎖の還元末端側より 2 つめ（もしくは 3 つめの）グリコシド結合を切断することが判明した。超好熱菌ではキチン鎖の非還元末端側を切断するキチナーゼとして、*Thermococcus kodakarensis* の ChiA などが知られているが [5]、*Tc*-ChiD のようにキチン鎖の還元末端側から切断する酵素は初めてである。今後、*Tc*-ChiD と既存の耐熱性キチナーゼを組み合わせて使用することで、高いキチン分解活性をもつシステムの開発や菌体の育種に繋がることが期待される [6]。

[References]
1. R. Huber *et al.*, ***Arch. Microbiol.***, 164: 255-264 (1995).
2. E. Andronopoulou and C. E. Vorgias, ***Extremophiles***, 7: 43-53 (2003).
3. E. Andronopoulou and C. E. Vorgias, ***Appl. Microbiol. Biotechnol***, 65, 694-702 (2004).
4. E. Andronopoulou and C. E. Vorgias, ***Protein Express. Purif.***, 35, 264-271 (2004).
5. T. Tanaka *et al*., ***Appl. Environ. Mirobiol.***, 65: 5338-5344 (1999).
6. A. Horiuchi *et al*., ***Appl. Environ. Mirobiol.***, 82: 3554-3562 (2016).

chitinase, hyperthermophile, archaea

発表責任者：金井保（kanai@sbchem.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3J33p01
講演日時：3 月 19 日 14:00～ J 校舎 33 会場

# Functional expression and characterization of fungal glucuronoyl esterases

○HiepHung Huynh, Manabu Arioka (Dept. of Biotech., The Univ. of Tokyo)

**Introduction:** The cellulose in the plant cell wall is mainly covered by hemicellulose and lignin. Thus, an efficient removal these components is a key step in the bioconversion of lignocellulose. However, the biomass contains a stubborn covalent linkage between the free carboxyl group of D-glucuronic acid in hemicellulose and the aromatic groups in lignin residues. The recent discovery of glucuronoyl esterase (GE) which is able to cleave this linkage could contribute to solving this issue. Herein, we report the identification and functional expression of two fungal GEs, AfGE of *Aspergillus fumigatus* and NcGE of *Neurospora crassa*.

**Method:** These CE15 of carbohydrate esterases were heterologously expressed in *Aspergillus oryzae* with pUNA vector and *Pichia pastoris* with pPICZα-A vector, respectively. Then $Ni^{2+}$-NTA and ion exchange chromatographies were used to purify the expressed GEs. The GE activity was measured by HPLC based on the ability to degrade two synthetic substrates that mimic this ester linkage. The enzymatic characteristics such as the effect of metal ions or other reagents were determined to further comprehend the reaction condition and improve the enzyme activity.

**Result:** NcGE and AfGE display the optimum pH at 7.0 and 5.0, respectively. AfGE is expected to be an industrially applicable enzyme due to its characteristic as a thermophilic enzyme with high resistance to temperature around 50°C. In addition, it also shows the highest substrate conversion velocity ($k_{cat}$ 67.1 $s^{-1}$) among the investigated GEs that is reflected to a significantly high catalytic efficiency ($k_{cat}/K_m$). On the other hand, based on the alignment of AfGE and NcGE with other GEs so far characterized, we propose 3 novel consensus sequences for GEs containing the catalytic triad: serine-histidine-glutamate.

*Aspergillus fumigatus*, *Neurospora crasssa*, glucuronoyl esterase

発表責任者：Manabu Arioka（arioka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3J33p02
講演日時：3 月 19 日 14:15～ J 校舎 33 会場

# Heterologous expression and characterization of GH26 beta-mannanases from a symbiotic protist community of the termite *Reticulitermes speratus*

○Yunhan HSU[1], Hirohiko Koizumi[1], Masato Otagiri[2], Shigeharu Moriya[2,3], Manabu Arioka[1]
([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]RIKEN Center for Sustainable Resource Science, [3]Bioanalytical Sciences Laboratory, Graduate School of Yokohama City University)

Termites play a vital role in the forest ecosystems by degrading lignocellulose which is the predominant cell wall component of woody plants. Lignocellulose digestion in termites involves activities of both the host and its symbionts consisting of prokaryotes and flagellated protists (single cell eukaryotes) in the hindgut. Indeed, protists possess both cellulases and hemicellulases but termites harbor only endoglucanases and β-glucosidases. Symbiotic protists in the hindgut of termites therefore provide a novel enzymatic resource for efficient lignocellulytic degradation of plant biomass. Mannan is widely distributed in nature as a part of hemicellulose in the plant cell wall. Endo-1,4-β-mannanase (EC 3.2.1.78) is one of the major plant mannan-degrading enzymes and is capable of cleaving internal β-1,4-linkage of two mannose moieties or between mannose and glucose. In this study, two β-mannanases, RsMan26A and RsMan26B, from a symbiotic protist community of the lower termite, *Reticulitermes speratus*, were successfully expressed in methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. RsMan26A and RsMan26B displayed similar substrate specificity in that both showed the highest catalytic efficiency ($k_{cat}/K_m$) toward galactomannan from locust bean gum followed by glucomannan (111.1~141.7 ml $mg^{-1}$ $s^{-1}$), whereas they exhibited relatively weaker catalytic efficiency toward β-mannan and galactomannan from guar gum (4.4~13.6 ml $mg^{-1}$ $s^{-1}$). The homology modeling results revealed that the two β-mannanases both displayed long open clefts harboring a unique hydrophobic platform ($Trp^{79}$) and an aromatic amino acid-rich region, $WFWWG^{181-185}$, which may play a key role in the recognition of glucosyl moieties in the substrate and the stabilization of the active site cleft. Our results could provide more insights into the enzymatic machinery of the mannanases from symbiotic protists of termites for efficient degradation of plant cell wall polysaccharides.

beta-mannanase, termite, symbiotic protist

発表責任者：Manabu Arioka（arioka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3J33p03
講演日時：3 月 19 日 14:30～ J 校舎 33 会場

*Aspergillus kawachii* 由来β-フルクトフラノシダーゼとフルクトースとの複合体のX線結晶構造解析

Crystal structure of *Aspergillus kawachii* ß-fructofuranosidase complexed with fructose

○長屋 美香[1]、木村 美代子[1]、佐藤 祥名[1]、平野 勝紹[2]、栃尾 巧[2]、西河 淳[1]、殿塚 隆史[1]([1]東京農工大院農、[2]物産フードサイエンス研究開発セ)

○Mika Nagaya[1], Miyoko Kimura[1], Shona Sato[1], Katsuaki Hirano[2], Takumi Tochio[2], Atsushi Nishikawa[1], Takashi Tonozuka[1] ([1]Tokyo Univ. of A&T, [2]R&D Center, B Food Science)

【目的】麹菌 *Aspergillus kawachii* の生産するβ-フルクトフラノシダーゼ（以下 *Ak*FFase）は、糖質加水分解酵素ファミリーGH32 に分類される酵素である。*Ak*FFase は加水分解活性のみならず糖転移活性を有し、オリゴ糖の生産に有用な酵素である。GH32 には、β-フルクトフラノシダーゼをはじめ、イヌリナーゼ、レバナーゼなど多くの酵素が存在するが、ほとんど糖転移活性を持たないものと *Ak*FFase のように糖転移活性を示すものが存在し、これらの酵素の構造機能相関に興味が持たれる。本研究では、*Ak*FFase と生成物であるフルクトースとの複合体のX線結晶構造解析を行った。

【方法】pET32a を用いた発現プラスミドを構築し、大腸菌 BL21(DE3)株によって *Ak*FFase を生産させた。Ni-NTA アガロースによるアフィニティークロマトグラフィーにより精製を行い、SDS-PAGE で単一バンドまで精製されたことを確認した。精製酵素はハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶化を行い、得られた結晶をフルクトース溶液にソーキングすることにより、フルクトースとの複合体を調製した。X線回折強度データは、高エネルギー加速器研究機構 PF AR-NW12A ビームラインにて収集した。位相の決定は、*Aspergillus japonicus* のβ-フルクトフラノシダーゼを用いた分子置換法によった。

【結果と考察】*Ak*FFase とフルクトースとの複合体の構造を、2.1-Å分解能で決定した。*Ak*FFase は、N 末端側の 5 枚の β シートから成る β プロペラドメイン、C 末端側の β サンドイッチ、および、これらのドメインをつなぐαヘリックスから成るリンカーより構成されており、これは多くの GH32 に共通して見られる構造であった。フルクトース分子は活性中心である β プロペラドメインの中心付近、および、酵素の表面にいくつか存在していた。電子密度マップより、活性中心のフルクトース分子はサブサイト-1 および+1 の両方に結合しており、活性中心に結合している糖はフルクトシルβ2→1 フルクトースとしてモデルを構築できることが判明した。

*Aspergillus kawachii*, ß-fructofuranosidase, GH32

講演番号：3J33p04
講演日時：3 月 19 日 14:45～ J 校舎 33 会場

麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来イソプリメベロース生成酵素の機能と構造
Function and structure of isoprimeverose producing enzyme from *Aspergillus oryzae*
○矢追 克郎[1]、松沢 智彦[1]、渡邊 真宏[2] ([1]産総研生物プロセス、[2]産総研機能化学)
○Katsuro Yaoi[1], Tomohiko Matsuzawa[1], Masahiro Watanabe[2] ([1]AIST BPRI, [2]AIST ISC)

イソプリメベロース生成酵素（IPase）は、キシログルカンオリゴ糖の非還元末端側のイソプリメベロース（α-D-Xyl*p*-(1,6)-D-Glc*p*）構造を特異的に認識して遊離させる非常にユニークな酵素である。このような作用機序を示す酵素は、現在までに IPase しか知られていない。このユニークかつ高い基質特異性は、植物細胞壁の主要成分であるキシログルカンの構造解析に非常に有用であり、植物細胞壁研究者の研究ツールとして長年利用されている。また、IPase はイソプリメベロースを特異的に遊離することから、イソプリメベロースのを効率的生産にも有用である。イソプリメベロースの生理機能は未解明な点も多いが、乳酸菌の取り込み能や資化能が確認されており、機能性オリゴ糖としての利用が期待できる。

IPase は、カビなど真核微生物が生産する酵素として古くから知られていたが、長年にわたって遺伝子クローニングには成功していなかった。近年我々は、世界で初めて原核微生物由来の IPase を単離して遺伝子クローニングと異種宿主発現に成功した。また、麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来の IPase のクローニングにも成功し、GH3 に属する酵素であることが明らかとなった。*Pichia pastoris* を用いた異種宿主発現系で組換え IPase を生産し、詳細な基質特異性を調べたところ、キシログルカンオリゴ糖からイソプリメベロースユニットを遊離させるだけで無く、高い糖転移活性も有していることが明らかになった。この転移活性を利用することで、キシログルカンオリゴ糖にイソプリメベロースユニットを転移して非天然型の新奇オリゴ糖を生産できることが明らかになった。

また、組換え IPase の結晶化を行い、SPring-8 BL44XU によりデータ収集を行った。GH3 family に属する構造既知の酵素をモデルとして分子置換法を試みた結果、分解能 1.98Åの立体構造解析に成功した。その結果、IPase は 2 量体を形成しており、モノマー単位では他の GH3 と同様、全部で 3 つのドメイン（TIM-barrel domain 26-411, α－β－α sandwich domain 412-660, Fibronectin type III-like domain 661-779）で構成されていることが分かった。また、活性部位ポケットの構造は、2 量体を形成することで初めて形成されることが推測された。本酵素は、ヘテロな 2 糖を認識するユニークな酵素であるが、その基質認識機構は未だ解明されていない。そこで、次に、プロダクトであるイソプリメベロースを IPese 結晶にソーキングしてデータ収集を行った結果、分解能 2.4Åの複合体構造の決定に至った。現在、各種変異体を作成して構造機能相関の解明を行っている。

isoprimeverose, xyloglucan, *Aspergillus oryzae*

発表責任者：矢追克郎（k-yaoi@aist.go.jp）

講演番号：3J33p05
講演日時：3 月 19 日 15:00～ J 校舎 33 会場

マンゴー由来α1,3/α1,4 フコース転移酵素遺伝子（MiFUT13）の同定・機能解析
Molecular cloning and characterization of novel α1,3/α1,4-fucosyltransferases from *Mangifera indica* L.
○岡田 貴裕、池田 義孝（佐大医）
○Takahiro OKADA, Yoshitaka IKEDA (Fac. Med., Saga Univ.)

ルイス a（Le$^a$）糖鎖は Galβ1,3(Fucα1,4)GlcNAc からなる構造を持ち、哺乳動物に共通する血液型抗原として知られる。高等植物においては、特に細胞外タンパク質に結合した複合型アスパラギン結合型糖鎖の分岐構造上に分布することから、細胞間接着や生体防御に重要な役割を果たす可能性が示唆されてきた。しかしながら、多くの植物種においてその生合成に関わる責任糖転移酵素群は未同定なままであり、Le$^a$ 含有糖鎖の生物的機能や発現メカニズムにはいまだに不明な点が多く残されている。本演題では、代表的な熱帯果樹であるマンゴーより Le$^a$ 糖鎖の生合成に関わる α1,3/α1,4-フコース転移酵素（FUT13）のホモログ遺伝子を新たに同定し、これにコードされるタンパク質の酵素活性を検討した結果について報告する。

アーウィン種マンゴーの果皮組織より mRNA を抽出し、これを鋳型として cDNA を調製した。既知のホモログ遺伝子群の塩基配列情報に基づき RT-PCR を行い、FUT13 候補遺伝子の cDNA を部分的に増幅した。さらに、その内部配列情報をもとに 5'および 3'RACE 法を行い、不明な末端領域の塩基配列を決定した。これらの結果をもとに RT-PCR を行い、増幅産物をクローニングした結果、相同な II 型膜タンパク質をコードする二種類の候補遺伝子 *MiFUT13A*、*MiFUT13B* が得られた。COS1 細胞株を宿主とした異種細胞遺伝子発現系を用いて各遺伝子にコードされるタンパク質を発現し、末端構造が異なる二種類の受容体糖鎖：lacto-*N*-tetraose、lacto-*N*-neo-tetraose に対するフコース転移酵素活性を検討した。その結果、組換え MiFUT13A、MiFUT13B はいずれも lacto-*N*-tetraose の GlcNAc 残基に α1,4 結合でフコースを転移し、Le$^a$ 構造の形成を触媒した。一方で、lacto-*N*-neo-tetraose に対する α1,3 フコース転移酵素活性は検出できなかった。

以上の検討により、*MiFUT13A*、*MiFUT13B* が典型的な植物型 α1,3/α1,4-フコース転移酵素をコードすることを実証した。また、各遺伝子にコードされるタンパク質は *N*-アセチルラクトサミン構造の立体配置を厳密に認識し、植物体内において I 型構造（Galβ1,3GlcNAc）を有する糖鎖のみを受容体基質として利用することが示唆された。現在、新たにクローニングしたルイス型 β1,3-ガラクトース転移酵素候補遺伝子（*MiGALT15*）の機能解析とともに、マンゴー果実における *MiFUT13* の発現と Le$^a$ 含有糖鎖の発現との相関の検討に取り組んでいる。

Lewis antigen, Protein glycosylation, *Mangifera indica* L.

発表責任者：岡田貴裕（e7316@cc.saga-u.ac.jp）

講演番号：3J33p06
講演日時：3 月 19 日 15:25～ J 校舎 33 会場

*Shinella* sp. NN-6 株由来の L-ラムノースイソメラーゼの諸性質の検討および希少糖生産
Characterization of L-rhamnose isomerase from *Shinella* sp. NN-6 and its application
○後藤 成暁[1]、十川 直也[1]、千葉 和也[1]、森本 兼司[2] ([1]香大農、[2]香大国際希少糖研究教育機構)
○Shigeaki GOTO[1], Naoya SOGAWA[1], Kazuya CHIBA[1], Kenji MORIMOTO[2] ([1]Kagawa Uviv., [2]Kagawa Univ.)

＜目的＞　希少糖とは、「自然界にその存在量が少ない単糖とその誘導体」であり、一部の希少糖は生理機能を有するため健康食品や医薬品への応用が望まれている。当研究室では微生物由来の異性化酵素を用いて希少糖の生産を行っている。我々が保有する *Shinella* sp. NN-6 株は L-ラムノースイソメラーゼを有しており、今回その諸性質と希少糖生産性について検討した。また、生産効率を改善するためにボロン酸ゲルと希少糖との親和性に着目し、ボロン酸ゲルを用いた希少ヘキソースの分離について検討した。

＜方法＞　NN-6 株を L-ラムノースを単一炭素源とする酵母エキス培地にて培養した。超音波処理により粗酵素を抽出し、塩化マンガン処理、熱処理、硫安分画、各種カラムクロマトグラフィーにより精製した後、本酵素の諸性質および希少糖生産性について検討した。また、ヘキソースとボロン酸ゲルとの親和性を検討した。溶出液としてリン酸ナトリウムまたはグリシン-NaOH 緩衝液(ともに pH 8.5)を用い、流速 0.4 mL/min、25ºC の条件で各糖液（50 mM、0.2 mL）を供した。希少糖の分離については､既報の異性化酵素により 4 種のケトヘキソースを基質として計 10 種の反応液を調製した。これらの希少糖反応液を同ボロン酸ゲルが充填されたカラムに供し、リン酸ナトリウム緩衝液(pH 8.0)を用い、流速 0.5 mL/min、25ºC の条件で溶出させ、分離後の各画分を HPLC で分析した。

＜結果および考察＞　本酵素は、60ºC、グリシン-NaOH 緩衝液 pH 9.0、$Mn^{2+}$を添加した条件で最大活性を示した。また、20ºC から 70ºC の温度で 1 時間熱処理した結果 50ºC まで安定であった。pH 安定性においては､8.0 から 11.0 において 80%以上の活性を維持した。D-プシコースおよび L-タガトースを基質として反応させると、D-アロースおよび L-タロースがそれぞれ生産された。ボロン酸ゲルとの親和性は、プシコース、イドース、タロース＞他 3 種のケトース＞他 6 種のアルドースの順であった。分離については、調製した 10 種の反応液のうち 7 種（計 14 種）の反応液の分離に成功した。残りの 3 種（計 6 種）は、各々のピークの重複や基質から反応産物への平衡比が低いことから分離の確認には至らなかった。しかしながら、これら 3 種の反応液中の 2 種の希少糖はボロン酸ゲルとの親和性に違いがあることから、今後条件を検討することで分離が可能になると示唆された。

rare sugars, L-rhamnose isomerase, boronic acid gel

講演番号：3J33p07
講演日時：3 月 19 日 15:40～ J 校舎 33 会場

# アルドース-ケトース間の異性化反応を利用したセロビオース 2-エピメラーゼの反応機構の解析
# Analysis of reaction mechanism of cellobiose 2-epimerase based on the isomerization activity

武藤 洋彦[1]、○佐分利 亘[1]、藤原 孝彰[2]、加藤 公児[2]、姚 閔[2]、森 春英[1] ([1]北大院農、[2]北大院生命)
Hirohiko Muto[1], ○Wataru SABURI[1], Takaaki Fujiwara[2], Koji Kato[2], Min Yao[2], Haruhide Mori[1] ([1]Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University, [2]Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University)

【背景・目的】セロビオース 2-エピメラーゼ (CE) は，β-(1→4)-結合からなる二糖の還元末端 Glc 残基を Man 残基にエピメリ化する．本酵素は $(\alpha/\alpha)_6$ バレル構造からなる触媒ドメインを持ち，２残基の His が一般酸・塩基触媒として働く．配列同一性は低いものの，この構造は単糖異性化酵素のアルドースケトースイソメラーゼ (AKI) やアシルグルコサミン 2-エピメラーゼ (AGE) と類似している．これらの酵素の反応はいずれも *cis*-エンジオール中間体を経由すると考えられているが，CE および AGE はエピメリ化，AKI は異性化 (アルドースとケトース間の変換) を主に触媒する．近年，*Caldicellulosiruptor saccharolyticus* など一部の CE がエピメリ化に加えて異性化も触媒することが報告され，異性化活性が未確認の CE の異性化活性に興味が持たれた．本研究では *Rhodothermus marinus* 由来 CE (RmCE) の異性化活性を確認するとともに，各種変異酵素の異性化反応の解析から CE 反応における触媒残基の機能を明らかにした．
【結果・考察】RmCE は 300 mM ラクチュロース (Gal-Fru) への反応において，同濃度 Gal-Glc へのエピメリ化活性 107 U/mg より著しく低いものの, 異性化活性 (ラクトース (Gal-Glc) 生成 3.26 mU/mg, エピラクトース (Gal-Man) 生成 1.78 mU/mg) を示した．*C. saccharolyticus* 由来 CE の同条件下の Gal-Fru 異性化活性 (Gal-Glc 生成+Gal-Man 生成) は 375 mU/mg であり，RmCE の活性はこの 1.3%であった．野生型酵素 (WT) とは異なり触媒残基変異酵素 H259A では Gal-Glc 生成速度が Gal-Man 生成の>6.3 倍 (Gal-Glc 生成 0.441 mU/mg, Gal-Man 生成<0.0699 mU/mg) であり，H390A では Gal-Man 生成速度が Gal-Glc 生成の>6.3 倍 (Gal-Glc 生成<0.0513 mU/mg, Gal-Man 生成 0.325 mU/mg) であった．Gal-Man 生成では His259 が Gal-Fru の Fru 残基の C1 からプロトンを引き抜き C2 に与え，Gal-Glc 生成では His390 がこのプロトンの授受を行うと考えられた．立体構造から His259 はエピメリ化において *cis*-エンジオール中間体にプロトンを与えて Gal-Man を，His390 は Gal-Glc を生成すると推定されているが，上記異性化のプロトン化機構はこの推定機構と一致した．また His259 による Gal-Fru と Gal-Man の間の異性化機構は AKI で提案されている Fru-Man 間の異性化機構に対応した．RmCE において基質還元末端糖残基の 2OH と水素結合する Tyr124，Asn196 および His200 の Ala 置換体では Gal-Glc エピメリ化活性が WT の 0.0362–0.179%に低下したが, Gal-Fru 異性化活性は WT の 45.6–1140%であり，His259 とも水素結合する Asn196 を置換した N196A は WT の 11 倍の値を示した．N196A の Gal-Fru からの Gal-Man 生成速度は Gal-Glc 生成の 3.9 倍であり, Gal-Man 生成への選択性が高まった．

cellobiose 2-epimerase, isomerization, reaction mechanism

発表責任者：佐分利 亘（saburiw@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：3J33p08
講演日時：3 月 19 日 15:55～ J 校舎 33 会場

*Arthrobacter globiformis* M30 由来 xylitol oxidase の精製と希少アルドース生産
Purification of xylitol oxidase from *Arthrobacter globiformis* M30 and application for rare aldose production

○熊谷 拓也[1]、吉原 明秀[1,2]、大谷 耕平[3]、秋光 和也[1,2]、何森 健[1,2] ([1]香川大農、[2]香川大・国際希少糖研究教育、[3]松谷化学)
○Takuya KUMAGAI[1], Akihide YOSHIHARA[1,2], Kouhei OHTANI[3], Kazuya AKIMITSU[1,2], Ken IZUMORI[1,2] ([1]Kagawa Univ., [2]International institute of Rare Sugar Research and Education, Kagawa Univ., [3]Matsutani Chemical Industry Co., Ltd)

・目的

様々な希少アルドースはケトースを基質として各種異性化酵素による異性化反応により生産される。しかし、この異性化反応は可逆的な平衡反応であり、純粋な希少アルドースを得るためには分離工程が必須である。本研究では、効率的な希少アルドース生産を目的として糖アルコールからアルドースへの酸化反応を触媒する *Arthrobacter globiformis* M30 由来 xylitol oxidase（XOX）に着目し、本酵素の酵素学的諸性質を検討し、希少アルドース生産を試みた。

・方法

*A. globiformis* M30 は誘導炭素源として 1%の xylitol を含む無機塩液体培地 10 L を用いて 30℃、24 時間培養した。得られた菌体は超音波破砕し、上清を粗酵素とした。*A. globiformis* M30 由来 XOX は硫安分画、HiPrep Phenyl HP、HiTrap Q HP、Resource Q、Superdex200 GL 10/300 カラムを用いたクロマトグラフィーによって精製した。この精製 XOX を用いて至適温度、至適 pH、pH 安定性、温度安定性、金属の影響、基質特異性を検討した。また、粗酵素を用いて糖アルコールから希少アルドース生産について検討した。

・結果

*A. globiformis* M30 から抽出した XOX は各種カラムクロマトグラフィーによって単一に精製され、単量体の分子量は 45 kDa であった。精製酵素を用いて、酵素学的諸性質の検討した結果、至適温度が 50℃、至適 pH がトリス塩酸緩衝液(pH9.0)、pH8.0~10.0 で比較的安定的であり、30℃以下で 100%の酵素活性を維持していた。また、金属の影響は特に見られなかった。基質特異性を検討した結果、最も高い活性を示した基質は xylitol であった。xylitol に対する酵素活性を 100%としたとき、D-sorbitol 98.9%、L-talitol 91.8%、galactitol 80.0%、L-arabitol 78.4%、D-mannitol 56.8%、L-iditol 28.3%、D-arabitol 13.4 %、D-talitol 8.68 %、allitol 2.11%、ribitol 0.526%、erythritol 0.263%の活性を示した。この結果より、*A. globiformis* M30 由来 XOX は炭素第 1 位、2 位、3 位が L-threo 型の糖アルコールに対して高い反応性を示すことが分かった。そこで、L-threo 型の糖アルコールである L-iditol から L-idose の生産を試みた結果、反応後に L-idose を確認した。この結果より、*A. globiformis* M30 由来 XOX は希少アルドース生産において有用な酵素であることが示された。

*Arthrobacter globiformis* M30, xylitol oxidase, rare aldose production

講演番号：3J33p09
講演日時：3 月 19 日 16:10～ J 校舎 33 会場

希少糖生産酵素 *Arthrobacter* 属由来 D-アルロース 3-エピメラーゼの基質複合体構造解析
X-ray structure analysis of *Arthrobacter* sp. D-allulose 3-epimerase in complex with its substrate

○吉田 裕美[1,3]、吉原 明秀[2,3]、Pushpa Kiran Gullapalli[4]、大谷 耕平[4]、秋光 和也[2,3]、何森 健[2,3]、神鳥 成弘[1,3]([1]香川大総合生命研究セ、[2]香川大農、[3]香川大国際希少糖研究教育、[4]松谷化学)
○Hiromi YOSHIDA[1,3], Akihide YOSHIHARA[2,3], Pushpa Kiran Gullapalli[4], Kouhei OHTANI[4], Kazuya AKIMITSU[2,3], Ken IZUMORI[2,3], Shigehiro KAMITORI[1,3] ([1]Life Sci. Res. Center, Kagawa Univ., [2]Fac. Agric., Kagawa Univ., [3]Int'l. Inst. Rare Sugar Res. and Educ., Kagawa Univ., [4]Matsutani Chemical Ind. Co., Ltd)

【目的】希少糖 D-アルロース(別名 D-プシコース)は天然には微量にしか存在しないが、血糖値上昇の抑制効果、動脈硬化の予防や肥満の抑制効果などが見いだされ、近年 D-アルロースを含む甘味料や食品、飲料が機能性食品として市販されている。D-アルロースは、天然に大量に存在する D-フルクトースから、基質特異性の広い *Pseudomonas cichorii* D-タガトース 3-エピメラーゼ(D-TE)を用いて生産が行われているが、D-アルロースに対して高い触媒活性を示す *Arthrobacter* 属由来 D-アルロース 3-エピメラーゼ (D-AE) がクローニングされ、その D-アルロースの生産性が評価されてきている。演者らは既に D-AE のリガンドフリーの構造を決定しているが、基質との複合体構造は得られていなかった。本研究では、*Arthrobacter* 属由来 D-AE の基質との複合体構造情報を得ることを目的に X 線結晶解析を行った。
【方法】C 末端に His タグを持つ D-AE を発現させ、アフィニティーカラムを用いて精製後、基質存在下での共結晶化を行った。得られた結晶を用いて、高エネルギー加速器研究機構 PF-AR NW12A、NE3A にてデータ収集を行った。
【結果】D-AE と D-フルクトースとの複合体構造、D-アルロースとの複合体構造をそれぞれ 1.72Å、1.95Å分解能で解析を行った。D-AE の構造は結晶中には非対称単位あたり 2 分子存在していたが、対称操作によりホモテトラマーを形成していた。D-AE のモノマー構造は、ホモダイマーを形成する D-TE のモノマー構造とよく類似しており、これらの活性部位も非常によく似ていた。D-AE の基質複合体構造の活性部位においては、基質と考えられる電子密度が見られ、現在精密化を行っている。

D-allulose (D-psicose) 3- epimerase, rare sugar, X-ray structure

発表責任者：吉田裕美（h.yoshi@med.kagawa-u.ac.jp）

講演番号：3J33p10
講演日時：3 月 19 日 16:25～ J 校舎 33 会場

# メタゲノム由来α-キシロシダーゼの単離と機能解析

# Screening, identification and characterization of metagenomic alpha-xylosidase

○松沢 智彦、木村 信忠、末永 光、矢追 克郎（産総研・生物プロセス）
○Tomohiko MATSUZAWA, Nobutada KIMURA, Hikaru SUENAGA, Katsuro YAOI (AIST BPRI)

土壌などの環境中には多種多様な微生物が存在しているが、その多くは人為的に培養することができないため、その遺伝子資源の利用は困難であった。メタゲノム法では、環境中の微生物から培養を介さずにゲノム DNA を抽出して解析を行うため、これまで培養できなかった微生物の遺伝子資源を利用することができる。我々は土壌由来メタゲノムを用いたファンクショナルスクリーニングによって新規α-キシロシダーゼを単離し、機能解析を行ったので本発表において報告する。

土壌由来メタゲノムが形質転換された大腸菌（約５万クローン）を培養し、その大腸菌の粗抽出液から *p*-nitrophenyl α-D-xylopyranoside(*p*NP α-D-Xyl)に対して活性を有する大腸菌クローンを選抜した。選抜された大腸菌クローンに形質転換されたメタゲノム由来 DNA 断片（約 40 kbp）を次世代シーケンサーによって解析したところ、30 の推定 ORF から構成されていた。その中に、α-キシロシダーゼと予想される ORF が１つ存在しており、本遺伝子を MeXyl31（Metagenomic α-xylosidase GH31）と命名して解析を進めた。

MeXyl31 はそのアミノ酸配列から Glycoside Hydrolase Family 31 に分類され、既知のα-キシロシダーゼと 50%程度の類似性であった。本酵素を精製して機能解析を行ったところ、至適 pH は 5.5、至適温度は 45℃であった。また、様々な基質に対して作用させたところ、*p*NP α-D-Xyl に対しては高い比活性を示すのに対し、イソプリメベロース（α-D-xylopyranose-(1,6)-D-glucopyranose）などのキシログルカンオリゴ糖への比活性は極めて低いことが明らかになった。この基質特異性は既知のα-キシロシダーゼとは異なっており、今後、さらなる解析を進めていく予定である。

xylosidase, metagenome, glycoside hydrolase

講演番号：3J33p11
講演日時：3 月 19 日 16:50～ J 校舎 33 会場

*Paenibacillus agaridevorans* 由来 β-アガラーゼの精製とその諸性質
Purification and characterization of beta-agarases from *Paenibacillus agaridevorans*
○田村 絵梨子[1]、和田 夏実[2]、稲村 俊秀[2]、舟根 和美[3]、一ノ瀬 仁美[1,2,4] ([1]信州大院、[2]信州大農、[3]農研機構食総研、[4]信州大菌類・微生物ダイナミズム創発研究センター)
○ Eriko TAMURA[1], Natsumi WADA[2], Toshihide INAMURA[2], Kazumi FUNANE[3], Hitomi ICHINOSE[1,2,4] ([1]Grad. Sch. Sci. Tech., Shinshu Univ., [2]Shinshu Univ., [3]NFRI, NARO, [4]CFMD, Shinshu Univ.)

【目的】寒天はアガロースを主成分とする多糖である。近年、寒天を分解して得られるオリゴ糖は機能性食品素材として注目されている。本研究では、*Paenibacillus agaridevorans* DSM1355 株が生産するアガラーゼを精製し、精製酵素を用いて諸性質を解析した。

【方法】寒天を含む培地で *P. agaridevorans* DSM1355 を培養し、培養上清に 70%飽和硫酸アンモニウムを加えて菌体外タンパク質を回収した。タンパク質を 20 mM トリス塩酸緩衝液（pH 8.5）に溶解し、透析して得られた粗酵素液を陰イオン交換カラム、ゲル濾過カラムに供してアガラーゼを分離した。SDS-PAGE にて、酵素の精製度の確認および分子量の推定を行った。アガラーゼ活性は、アガロースを基質として反応を行い、還元糖量測定、薄層クロマトグラフィー、イオンクロマトグラフィーによって反応生成物を検出、定量することによって測定した。

【結果】粗酵素液をザイモグラム分析に供し、アガラーゼ活性を示す 2 つのタンパク質を見出した。これらを各種クロマトグラフィーにて分離し、SDS-PAGE 上で単一のバンドとなるまで精製した。分子量の大きいものからアガラーゼ A（112.6 kDa）、アガラーゼ B（95.7 kDa）と名付けた。精製酵素を用い 15 分間反応させてアガラーゼ活性を評価したところ、アガラーゼ A は、40℃、pH 8.5 の条件で最大活性を示した。一定温度において pH8.5 の条件で 30 分間インキュベートした時、40℃では 60%、35℃以下では 90%以上が安定であった。一方、アガラーゼ B は、50℃、pH10 の条件で最大活性を示した。一定温度において pH 10 の条件で 30 分インキュベートした時、50℃まで安定であった。反応生成物を TLC にて分析した結果、アガラーゼ A とアガラーゼ B は異なる分解パターンを示したが、共に最終生成物として 4 糖と 6 糖のネオアガロオリゴ糖を生産した。以上のことより、両酵素は塩基性側で働く β - アガラーゼであることが明らかとなった。

Agarase, *Paenibacillus*

講演番号：3J33p12
講演日時：3 月 19 日 17:05～ J 校舎 33 会場

# 酵母 split-ubiquitin システムを利用したヒト MPDU1 蛋白質に関する物理的相互作用の解析

# Analyses on physical interactions of human MPDU1 protein using the yeast split-ubiquitin system

○高橋 哲夫、傅能 康成、岩本 栄介、田中 智恵美（東海大工）
○Tetsuo Takahashi, Yasunari Dennou, Eisuke Iwamoto, Chiemi Tanaka (Tokai Univ.)

【目的】ドリコール中間体(dolichol-linked oligosaccharide; DLO)は、真核細胞の蛋白質の *N*-グリカンの前駆体である。粗面小胞体(rER)膜でのその生合成過程はドリコールサイクルと呼ばれ、rER 膜に局在する糖転移酵素やフリッパーゼなどにより成り立っている。mannose-P-dolichol utilization defect 1 (MPDU1) は、高等真核細胞のドリコールサイクルにおいて rER 膜で生合成されたドリコールリン酸マンノース(Dol-P-Man)の細胞質側から内腔側への反転に重要な役割を果たす rER 膜局在蛋白質である。これまでに我々は、酵母 split-ubiquitin システムを利用してヒト MPDU1(hMPDU1)の rER 膜上での配向性の解析を行い、(1)本蛋白質が rER 膜を少なくとも 6 回貫通し、N 末端及び C-末端を細胞質側に配向していること、(2)本蛋白質同士は、rER 膜上で N 末端と C 末端を介して物理的に相互作用して二量体(または少量体)を形成し、その物理的相互作用には、アミノ酸残基 100 番目から 215 番目までの領域が重要な役割を果たしていること、(3)本蛋白質が同じくドリコールサイクルで働くヒト Dol-P-Man 合成酵素の膜貫通サブユニット(hDPM3)、ヒトドリコールピロリン酸ホスファターゼ(hDPP1)及び Dol-P-Man 依存性マンノース転移酵素(hALG9)と物理的に相互作用していることを明らかにしてきた。そこで本研究では、上記(3)について更に解析を進め、この 3 種類の酵素との相互作用に重要な hMPDU1 中の領域をより限定することにした。

【方法及び結果】hMPDU1 の C-末端側から疎水性領域(hydrophobic region; HR)を段階的に欠失させた 3 種類の欠失ベイト発現コンストラクト(pBT-STE-hMPDU1HR2,3,5)を作製した。これらを上記 3 種類の酵素を発現するプレイコンストラクト(pPR-N-hDPM3, pPR-N-hDPP1, pPR-N-hALG9) とともに 1 つずつ組み合わせて酵母 NMY51 株を二重形質転換した。得られたベイト/プレイ共発現株を用いて、2 種類の相互作用レポーター検出用培地(SD-LWH および SD-LWHA)上で増殖性試験を行った。その結果、全長 hMPDU1 ベイトと全長 hDPP1 プレイで検出された相互作用が pBT-STE-hMPDU1HR5/pPR-N-hDPP1 共発現株で消失し、全長 hMPDU1 ベイトと全長 hDPM3 プレイで検出された相互作用が pBT-STE-hMPDU1HR3/pPR-N-hDPM3 共発現株で消失し、全長 hMPDU1 ベイトと全長 hALG9 プレイで検出された相互作用が pBT-STE-hMPDU1HR2/pPR-N-hALG9 共発現株で消失した。これらの観察結果は、hMPDU1 蛋白中の異なる領域で 3 種類の酵素との結合が生じている可能性を示唆する。現在、本蛋白質と相互作用する 3 種類の酵素側の必要領域の限定を目的とした解析を進めている。

split-ubiquitin system, MPDU1, physical interaction

発表責任者：高橋哲夫（tetsuo@keyaki.cc.u-tokai.ac.jp）

講演番号：3J33p13
講演日時：3 月 19 日 17:20～ J 校舎 33 会場

Interaction between proteins involved in the biosynthesis of EPA-containing phospholipids in a psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10

○Tsai-min CHEN, Ryutaro OGURA, Takuya OGAWA, Jun KAWAMOTO, Tatsuo KURIHARA
(Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.)

**[Background and Objective]**

Eicosapentaenoic acid (EPA) is an omega-3 polyunsaturated fatty acid that is known to play beneficial roles in human health. EPA also plays an important role in various other organisms. Those include cold-adapted marine bacteria that have an EPA-biosynthesis system. Previously, we found that EPA is related to low-temperature adaptation of a psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10. Our studies suggested that EPA plays a role in membrane organization and forms membrane microdomain at the cell division site at low temperatures. For biosynthesis of EPA in this strain, five genes named *orf2*, *orf5*, *orf6*, *orf7*, and *orf8* are required. In this study, we analyzed interaction between the proteins encoded by these genes to examine whether they form a protein complex for the synthesis of EPA.

**[Methods]**

We used an *orf5*-disrupted mutant (Δ*orf5*) for pull-down experiments because we found that this strain gives low background results. The strain was aerobically grown at 4 ˚C in LB (Luria-Bertani) medium. The cells were harvested, re-suspended in a buffer containing 20 mM imidazole, and lysed by sonication. The supernatant obtained from the lysate was mixed with magnetic beads coated with purified recombinant proteins, His-tagged Orf8 or His-tagged Orf6, and incubated overnight at 4 ˚C. The magnetic beads were then washed with a buffer containing 20 mM imidazole, and proteins bound to the beads were eluted with an elution buffer containing 500 mM imidazole. The eluate was subjected to SDS-PAGE and western blot analysis with antibodies raised against Orf7 and PlsC1, 1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase responsible for the biosynthesis of EPA-containing phospholipids.

**[Results and Discussion]**

We found that Orf7 and PlsC1 interacted with His-tagged Orf8. We also found interaction between Orf7 and His-tagged Orf6. Combined with our previous results showing *in vitro* interaction between Orf5 and His-tagged Orf8, we postulates that Orf5, Orf6, Orf7, Orf8, and PlsC1 form a protein complex. Formation of this protein complex is probably important for efficient synthesis of EPA and EPA-containing phospholipids. Our previous experiments suggested that Orf5 and Orf8 are enriched at the cell division site of *S. livingstonensis* Ac10. Thus the protein complex containing Orf5, Orf6, Orf7, Orf8, and PlsC1 is likely enriched at the cell division site and facilitates the formation of EPA-containing microdomain at this site for efficient cell division of this strain at low temperatures.

eicosapentaenoic acid, 1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase, protein-protein interaction

発表責任者：KURIHARA Tatsuo（kurihara@mbc.kuicr.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3J33p14
講演日時：3 月 19 日 17:35～ J 校舎 33 会場

# 低温性 *Shewanella* 属細菌由来リゾホスファチジン酸アシル基転移酵素 PlsC の機能解析

# Functional analysis of lysophosphatidic acid acyltransferase PlsC from a cold-adapted *Shewanella* bacterium

○田中 麻子、小川 拓哉、川本 純、栗原 達夫（京大化研）
○Asako TANAKA, Takuya OGAWA, Jun KAWAMOTO, Tatsuo KURIHARA (Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.)

【目的】リゾホスファチジン酸アシル基転移酵素（PlsC）は、リゾホスファチジン酸（LPA）の *sn*-2 位をアシル化し、リン脂質の共通の前駆体であるホスファチジン酸（PA）を合成する反応を触媒する。本研究で用いる *Shewanella livingstonensis* Ac10 は、南極海水から単離された低温細菌で、4-25℃で生育するグラム陰性菌である。我々は以前、本菌が低温条件下で、リン脂質の構成成分としてω-3 多価不飽和脂肪酸のエイコサペンタエン酸（EPA）を生産することを発見し、これらが本菌の低温での生育に重要な役割を担うことを報告した。その後の研究から本菌の 5 つの遺伝子が大腸菌 PlsC のホモログをコードしており、その中の PlsC1 が本菌における EPA 含有リン脂質の生合成を担っているということがわかった。そこで我々は *S. livingstonensis* Ac10 の低温適応における PlsC1 の役割を明らかにすることを目的として、本研究では PlsC1 の可溶化・精製を行い酵素学的な機能解析に取り組んだ。
【方法・結果】*plsC1* を pET ベクターに導入し、大腸菌を宿主として用いて異種発現した。PlsC1 は膜貫通型であると予想されるため、発現株から膜画分を抽出した後に、種々の界面活性剤を用いて PlsC1 の可溶化条件を検討した。得られた可溶化画分を Ni-NTA カラムに供したところ、高い収率（0.2 mg/g of wet cells）で、活性を保持した状態の精製 PlsC1 を得ることができた。基質として脂肪酸アシル CoA と 1-オレオイル-LPA を用いて酵素反応を行い、種々の条件で活性を測定した。活性測定は Ellman 法により副生成物である CoA-SH のチオール基を定量して行った。PlsC1 の酵素学的性質を調査したところ、至適温度は 20-25℃、至適 pH は 8.5-9.0 であった。また $Mg^{2+}$などの金属イオン依存的に活性を示し、EPA などの不飽和脂肪酸が結合したアシル CoA に対して高い活性を示した。一方パルミチン酸やステアリン酸などの直鎖飽和脂肪酸が結合したアシル CoA に対する活性は低かった。その他の酵素学的特性や構造的特徴についても解析を進めており、これらについても報告したい。
【考察】従来、PlsC ホモログ酵素が活性を保った状態で精製された例はなかったが、本研究において可溶化条件を検討することにより、活性を保った状態で PlsC を精製し、酵素学的な機能解析を行うことに初めて成功した。PlsC1 が飽和脂肪酸よりも不飽和脂肪酸が結合したアシル CoA に対して高い活性を示したことから、本酵素の基質結合部位は、立体障害などの要因によって直鎖状の脂肪酸が結合したアシル CoA が結合しにくい構造を有している可能性が示唆される。

phospholipid, acyltransferase, eicosapentaenoic acid

講演番号：3J33p15
講演日時：3 月 19 日 17:50～ J 校舎 33 会場

低温性 *Shewanella* 属細菌の色素生産に関与するリゾホスファチジン酸アシル基転移酵素ホモログの機能解析
Functional analysis of a homolog of lysophosphatidic acid acyltransferase from a cold-adapted *Shewanella* bacterium that is involved in pigment production
○小川 拓哉、太田 昌希、川本 純、栗原 達夫（京大化研）
○Takuya OGAWA, Masaki OTA, Jun KAWAMOTO, Tatsuo KURIHARA (Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.)

【背景】*Shewanella livingstonensis* Ac10 は南極海水から単離した低温性のグラム陰性細菌である。ゲノム情報から、*S. livingstonensis* Ac10 はリゾホスファチジン酸 (LPA) アシル基転移酵素 PlsC のホモログを 5 つ有することがわかっている (PlsC1−PlsC5)。PlsC はリン脂質の *de novo* 合成酵素の 1 つであり、LPA の *sn*-2 位に脂肪酸アシル基を転移することでホスファチジン酸 (PA) を合成する。我々はこれまでに、PlsC3 を除く 4 つの PlsC ホモログが PA 合成活性を示し、それぞれ異なる基質特異性を有することを見出している。たとえば、遺伝子欠損株のリン脂質組成を分析することで、*in vivo* において PlsC1 が長鎖多価不飽和脂肪酸の 1 種であるエイコサペンタエン酸を、一方で、PlsC4 が 11-メチルラウリン酸などの分岐鎖脂肪酸をリン脂質に導入することを明らかにした。脂質二重膜は脂肪酸組成に応じて膜厚や流動性といった物理化学的特性が変化することが知られている。したがって、複数の PlsC ホモログが存在することで多様なリン脂質が生じ、膜全体ないし局所的に複雑な疎水性環境を生み出すことに寄与していると考えられる。上述の 4 つの PlsC ホモログと異なり PlsC3 の機能は長らく不分明であったが、最近の実験結果から PlsC3 のはたらきに迫る手がかりが得られてきており、本発表ではこれについて報告する。
【実験と結果】Bligh−Dyer 法により全脂質を抽出し質量分析に供したところ、リン脂質の組成は *plsC3* 欠損株と野生株とのあいだで顕著な差が見られなかった。一方、抽出した脂質を順相 TLC により分析したところ、黄色を呈するスポットが現れた。順相 TLC における低い $R_f$ 値、および、冷アセトンに不溶であったことから、この未知の色素は極性脂質であることが示唆された。黄色を呈する生体脂質としてはキノンやカロテノイドが代表的であるが、いずれも非極性であり、これらとは異なる構造をもつことが考えられた。ゲノム上で *plsC3* は機能未知の遺伝子クラスターに含まれる。Cimermancic らはインフォマティクスの手法により、同クラスターが広範な細菌に保存され、ポリケチド様化合物の生合成に関与することを提唱している [Cell (2014) **158**:412-421]。最終産物の構造や各遺伝子の役割は未だにわかっていないが、彼らは部分的な構造解析を行い、黄色を呈するポリエン構造を明らかにした。我々が発見した色素化合物はこの生合成経路における中間体であるかもしれない。カロテノイドに見られるようにポリエン構造は呈色するとともに抗酸化活性を示す。このことと一致して、$H_2O_2$ 存在下での *plsC3* 欠損株の生育は野生株と比べて有意に速かった。現在、この未知の黄色色素の構造解析を進めており、これについてもあわせて報告したい。

acyltransferase, pigment, polyene

発表責任者：栗原達夫（kurihara@mbc.kuicr.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3J33p16
講演日時：3 月 19 日 18:05～ J 校舎 33 会場

必須脂肪酸欠乏における Elovl5 のリン酸化を介した活性制御機構の解明
The regulatory mechanism of elongation activity of Elovl5 via phosphorylation in essential fatty acid deficiency
○林 優里[1]、市 育代[2,3]、山野 美怜[1]、藤原 葉子[2,3]（[1]お茶大院・ライフ、[2]お茶大・基幹研究院、[3]お茶大・HLI 研）
○ Yuri Hayashi[1], Ikuyo Ichi[2,3], Misato Yamano[1], Yoko Fujiwara[2,3] ([1]Grad. Sch. Life Sci., Ochanomizu Univ., [2]Fac. Core Res., Ochanomizu Univ., [3]Inst. HLI., Ochanomizu Univ.)

【背景】
脂肪酸伸長酵素 Elovl5 は多価不飽和脂肪酸(PUFA)に対して活性を有する酵素として知られている。一方で、我々は必須脂肪酸欠乏状態にある培養細胞を用いて Elovl5 が一価不飽和脂肪酸である C18:1n-9 に対して活性を有し、C20:3n-9(ミード酸)の産生に関与することを明らかにしている。
[C18:1n-9→(Elovl5)→C20:1n-9→(Fads2)→C20:2n-9→(Fads1)→C20:3n-9]
このことから、Elovl5 の C18:1n-9 に対する伸長活性は必須脂肪酸欠乏状態に特異的である可能性が考えられる。本研究では、必須脂肪酸欠乏への PUFA 添加によって Elovl5 の伸長活性が変化するか調べ、その活性制御機構について検討した。
【方法】
NIH3T3 細胞の播種 48 時間後に PUFA[アラキドン酸 25 μM + EPA 25 μM]を添加し、24 時間後に細胞を回収した。Elovl5 の活性を評価するにあたり、細胞から抽出した膜画分を用いて、基質である C18:1n-9-CoA とマロニル CoA を混合し in vitro での酵素反応を行い、伸長産物量を GC-MS にて測定した。
【結果・考察】
PUFA を添加した細胞を用いて活性を評価した結果、伸長産物である C20:1n-9 は顕著に減少し、Elovl5 の C18:1n-9 への伸長活性は、必須脂肪酸欠乏に特異的な現象であることがわかった。そこで、PUFA による Elovl5 の活性変化の要因を明らかにするため、Elovl5 の遺伝子発現およびタンパク質発現の変化を調べたが、活性変化の要因となる顕著な減少はみられなかった。次に、タンパク質の翻訳後修飾の可能性を検討するにあたり、Phos tag-PAGE を用いて Elovl5 のリン酸化を調べた。その結果、PUFA を添加した細胞において Elovl5 のリン酸化タンパク質が存在していることがわかった。さらに、Elovl5 のリン酸化が生じるメカニズムについて検討した。Elovl5 には PKC によるリン酸化が報告されているアミノ酸配列が存在していることから、PKC の特異的阻害剤を用いて検討を行ったが、Elovl5 のリン酸化に変化はみられなかった。現在、他種のキナーゼ阻害剤を用いて Elovl5 の脱リン酸化について検討を行っている。以上より、Elovl5 は必須脂肪酸欠乏状態では C18:1n-9 に対して伸長活性を有してミード酸の産生に関与するが、PUFA 添加時にはリン酸化修飾を受けてミード酸の産生が抑制される可能性が示唆された。

fatty acid elongation, phosphorylation, essential fatty acid

講演番号：3J34a01
講演日時：3 月 19 日 09:20～ J 校舎 34 会場

*Pimelobacter* sp. Z-483 株由来メタロプロテアーゼ遺伝子のクローニングと発現
Cloning and Expression of Metalloprotease Produced by *Pimelobacter* sp. Z-483
○大橋 大志[1]、浴野 圭輔[2]、尾山 廣[1]([1]摂南大理工、[2]崇城大生物生命)
○taishi OOHASHI[1], Keisuke EKINO[2], Hiroshi OYAMA[1] ([1]Setsunan Univ., [2]Sojo Univ.)

【目的】*Pimelobacter* sp. Z-483 株は、pH9.0、50℃に最適反応条件を有するアルカリプロテアーゼ(Z-483-P)を菌体外に分泌する。Z-483-P は、1,10-フェナントロリンと塩化水銀に阻害されるが、EDTA やホスホラミドンの影響を受けない。N 末端アミノ酸配列は *Myxoxoccus xanthus* のアルカリエラスターゼと類似するが、インスリンＢ鎖に対する基質特異性が異なるなどのユニークな特徴を有する。本研究では、Z-483-P の構造と触媒機能の解析を目的に、データーベース解析を基に、Z-483-P 遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定すると共に、大腸菌の宿主・ベクター系を用いて発現を試みた。
【方法】Z-483-P 遺伝子の発現は、*Escherichia coli* KRX 株と pET25b ベクターを用いて行った。組換え大腸菌を LB 培地で培養し、ラムノースと IPTG(終濃度：0.1mM)により Z-483-P 遺伝子の発現を誘導した。菌体破砕上清と残渣をサンプルに、抗 His-tag 抗体によるウエスタンブロッティングで発現を確認した。酵素活性は、EDTA または 1,10-フェナントロリン処理後のサンプル 20μL を、1%カゼインを含む寒天プレート上のペーパーディスクに添加し、37℃、18 時間加温した。塩酸(2N)を重層後のハロー形成の有無により活性を確認した。
【結果・考察】N 末端アミノ酸配列 13 残基を基に BLAST 検索を行ったところ、*Myxococcus stipitatus* の亜鉛プロテアーゼとの間に高い相同性が示された。N 末端アミノ酸配列と保存された亜鉛結合モチーフ(HEXXHXXGXXH)配列を基にプライマーを作成し、Z-483 株の染色体 DNA から degenerate PCR を行った。得られた断片の塩基配列を決定し、その情報を基に inverse PCR を行って Z-483-P の構造遺伝子を含む領域をクローニングした。得られた遺伝子は、N 末端の上流側に 86 残基のプレプロ配列が存在し、*Nocardiodes* 由来の亜鉛依存性 super family、M16 に属することが分かった。プレプロ領域を含む Z-483-P 遺伝子の両端に PCR で制限酵素断片を挿入し、pET25b ベクターに連結した。大腸菌 KRX 株を形質転換後、37℃、3 時間、0.1% ラムノース(終濃度)で発現を誘導したところ、菌体の破砕上清と残渣に抗 His-tag 抗体のシグナルが確認された。組換え Z-483-P は大部分が封入体として発現されたが、上清画分に微弱ながらカゼイン分解活性が検出されたことから、成熟型に変換された可能性が示唆された。現在、プレプロ領域の欠失変異体の発現と菌体破砕残渣の可溶化及び Refolding 条件の検討、枯草菌での発現系の構築を進めている。

Zinc binding motif, Peputidase M16

講演番号：3J34a02
講演日時：3 月 19 日 09:35～ J 校舎 34 会場

# カルパイン 3 の自己分解と活性化について
# CAPN3-its autolysis and activation

○小野 弥子、土井 奈穂子、反町 洋之（東京都医学研）
○Yasuko ONO, Naoko DOI, Hiroyuki SORIMACHI (TMIMS)

カルパイン 3 (CAPN3)は、細胞内システインプロテアーゼの一種であり、プロテアーゼドメイン(CysPc)を共通構造とするカルパインファミリーに属する。筋細胞以外に発現させた CAPN3 は、CysPc が二分割された状態の自己分解断片(CAPN3-N および CAPN3-C)となる。これらの断片は、単独ではプロテアーゼ活性を示さないが、分子間相補によりプロテアーゼとして復活するという、ほ乳類プロテアーゼではユニークな性質を示す。
本研究では、CAPN3 分子間相補に関する構造機能相関を解析し、CAPN3 の制御機構全体におけるこの現象の意義を再考察することを目的とした。
1) 合理的なアプローチとして、活性化状態の立体構造が明らかにされている CAPN2 との相同性をもとに、複数の変異体を設計し、分子間相補に関わる領域及びその特徴を解析した。
2) 自己分解活性減弱型の CAPN3 変異体を、プロテアーゼドメインに重点をおいて新たにスクリーニングし、自己分解活性と基質分解活性のバランスについて比較検討した。

ヒトでは、*CAPN3* の変異が劣性遺伝的に肢帯型筋ジストロフィー2A 型(LGMD2A)を引き起こす。また遺伝子改変マウスを用いた結果より、CAPN3 のプロテアーゼ活性不全が LGMD2A を発症することも明らかにされている。しかし、プロテアーゼとしての CAPN3 の動態や、活性不全により骨格筋組織が被る具体的なダメージを含めて LGMD2A 発症機構はまだ不明である。最近になって見出された CAPN3 のプロテアーゼ活性が自己分解断片による分子間相補によって復元されるという現象から、CAPN3 の構造機能相関を見直すことの意義、及び、CAPN3 の基質及び機能を明確にするためにどのような可能性が示されるのかについて議論する。

calpain, protease, complementation

発表責任者：小野弥子（ono-ys@igakuken.or.jp）

講演番号：3J34a03
講演日時：3 月 19 日 09:50～ J 校舎 34 会場

# カルパインの特性を規定する基質特異性の定量的構造-活性相関解析

# Quantitative sutructure-activity relationship analysis of calpain substrate specificity

○大内 史子[1]、小山 傑[1,2]、進藤 真由美[3]、馬見塚 拓[4]、瀧川 一学[5]、尾嶋 孝一[6]、秦 勝志[1]、小野 弥子[1]、反町 洋之[1] ([1]都医学研・カルパイン、[2]旭化成ファーマ医薬研究センター、[3]都医学研・基盤技術研究センター、[4]京大・化研、[5]北大院・情報科学、[6]農研機構・畜産研)

○Fumiko Shinkai-Ouchi[1], Suguru Koyama[1,2], Mayumi Shindo[3], Hiroshi Mamituska[4], Ichigaku Takigawa[5], Koichi Ojima[6], Shoji Hata[1], Yasuko Ono[1], Hiroyuki Sorimachi[1] ([1]Calpain, Tokyo Metro. Inst. Med. Sci., [2]Asahi Kasei Pharma, [3]Cent. Basic Tech. Res., Tokyo Metro. Inst. Med. Sci., [4]Kyoto Univ., [5]Hokkaido Univ., [6]NARO)

カルパインは真核生物に広く保存されている細胞内カルシウム依存的 Cys プロテアーゼであり、基質となるタンパク質を限定分解することでその機能・構造を調節している。カルパインの機能不全は神経変性疾患、筋疾患をはじめ様々なヒト病態と関連している。よって、カルパインの基質切断部位の選択性（＝基質特異性）を理解することは、カルパインの生理的な機能を解明する重要な情報となる。

生理的条件下では、基質は特定の部位でカルパインにより限定分解される。しかし、切断部位周辺のアミノ酸配列情報を利用した部位特異的スコア行列法などの解析からは、比較的広い領域に緩やかな選択性が認められている。そのため、多くの切断可能な部位から生理的な切断部位が厳密に選択される機構には未解明の部分が多い。そこで本研究では、ペプチドライブラリーのデグラドミクスとアミノ酸記述子（20 種のアミノ酸に特定の値を付与する特性のこと）を用いた機械学習によるアプローチにより上記の現象を解析し、カルパインの基質特異性の解明を試みた。

まず、既知の切断部位を挟んで前後 10 残基の 20mer ペプチド 87 種類を合成した。これらを一定条件下でカルパイン-1 または-2 で切断し、その効率を定量プロテオミクスの手法で測定した。これを 1300 以上のアミノ酸記述子と組合せて、カルパインの基質特異性を解析し、定量的構造-活性相関(QSAR)解析法を基盤とする切断部位予測モデルの構築を試みた。その結果、カルパインの興味深い現象として以下を見出した。1)計 483 部位（新規:360）が検出され、切断点は中央よりＣ末端側に偏っていた。即ち、カルパインは切断点のＮ末端側の認識領域がより広いと推測された。2)119 部位の切断効率を算出した結果、最大で 137 倍の差が存在した。3)カルパイン-1 および-2 による切断効率は多くの切断点で同程度だったが、P9-P7、P5’の嗜好性に差があった。4) P2、P3’、P4’の性質や P2-P1 の組合せが切断効率に大きく影響した。

これらを基にベイズモデルを構築し、構築に用いなかった 132 切断点について切断予測した結果、陽性予測率 87.5%を達成した（既存の全予測器を上回った）。また、このモデルと高次構造情報から予測したミオグロビンの切断部位が実際にカルパインで切断されたことから、その実用性を確認した。少なくとも一部の切断部位予測が可能となったことで、カルパインの基質認識機構、阻害剤との相互作用機構をより包括的に理解可能となった。その意義について考察する。

calpain, substrate specificity, prediction of cleavage sites

講演番号：3J34a04
講演日時：3 月 19 日 10:05～ J 校舎 34 会場

# 放線菌由来アミノペプチダーゼによるペプチド分解評価系

# Evaluation on degradation of tryptic peptides by using *Streptomyces* aminopeptidases

○畑中 唯史、裏地 美杉、万 クン（岡山生物研）
○Tadashi Hatanaka, Misugi Uraji, Kun Wan (RIBS, Okayama)

【背景および目的】

放線菌は、様々なタンパク質を菌体外に分泌することが知られ、タンパク質生産の有用宿主として、近年注目を集めている。我々は、従来から放線菌由来ペプチダーゼの研究を行ってきた。その中で、当グループ取得放線菌 *Streptomyces cinnamonues* TH-2 株が、大量に金属プロテアーゼ（SCMP）を分泌することを見出した。SCMP のプロモーターは強力であり、これを用いた発現系は、食品加工用酵素の商業生産に応用されている。また我々は、TH-2 株は、SCMP のみならず、ホスホリパーゼ D や、M28 アミノペプチダーゼ*といった有用な酵素を分泌することを明らかにしてきた。

本発表では、放線菌由来アミノペプチダーゼのペプチドに対する分解能力を評価するための評価系を構築することを目的とする。

【方法および結果】

ウシ由来カゼインのトリプシン消化物を作成し、逆相カラムとイオントラップ型質量分析計を用いて、既報のアレルゲンペプチドの分析を試みた。その結果、2 種のアレルゲンペプチド（VLPVPQK および FFVAPFPEVFGK）を検出することができた。これらは、苦味ペプチドとしても知られており、本発表では、この 2 種をモデルに、アミノペプチダーゼのペプチド分解能力を評価することとした。

トリプシン消化物を基質に、*S. lividans* 1326 株を宿主として分泌発現した TH-2 株由来 M28 アミノペプチダーゼを作用させた。反応物を分析したところ、残念ながら VLPVPQK に対しては、ほとんど分解能力を示すことが出来なかった。一方、FFVAPFPEVFGK に対しては、継時的に APFPEVFGK に相当するペプチドが増加し、N 末端から 3 個のアミノ酸を遊離させる能力を有することが示された。N 末端から 2 番目にプロリンが存在すると、反応が進行しないことは既に明らかにしており**、これまで得た結果とよく一致した。これらのことから、さらなる分解には、他種アミノペプチダーゼとの併用の必要性が示唆された。

【参考文献】*J. Arima, M. Iwabuchi, T. Hatanaka, Biochem. Biophys. Res. Commun. 317(2), 531-538(2004)
**J. Arima, Y.Uesugi, M.Iwabuchi, T. Hatanaka, Appl. Microb. Biotechnol. 70(5), 541-547(2006)

aminopeptidase, allergenic peptide, *Streptomyces*

発表責任者：畑中唯史（hatanaka@bio-ribs.com）

講演番号：3J34a05
講演日時：3 月 19 日 10:20～ J 校舎 34 会場

放線菌由来アミノペプチダーゼによるアレルゲンペプチドの分解
Evaluation on degradation of tryptic peptides by using *Streptomyces* aminopeptidases
○万 クン、裏地 美杉、畑中 唯史（岡山県生物科学研究所）
○Kun WAN, Misugi URAJI, Tadashi HATANAKA (RIBS, Okayama)

【背景および目的】
放線菌は、様々なタンパク質を菌体外に分泌することが知られ、タンパク質生産の有用宿主として、近年注目を集めている。我々は、従来から放線菌由来ペプチダーゼの研究を行ってきた。その中で、当グループ取得放線菌 *Streptomyces cinnamonues* TH-2 株が、ホスホリパーゼ D や、M28 アミノペプチダーゼ*といった有用な酵素を分泌することを明らかにしてきた。また、TH-2 株のゲノムを解読し、国立遺伝研 MiGAP によるアノテーションにより、3 種の M1 アミノペプチダーゼを見出した。*S. lividans* 1326 株を宿主に発現させたところ、1 種のみが発現した。前演題で、TH-2 株由来 M28 アミノペプチダーゼのみでは、カゼイン由来アレルゲンペプチドに対して、分解能力が低いことを明らかにしている。
本発表では、TH-2 株由来 M1 あるいは M28 アミノペプチダーゼと、*S.costaricanus*TH-4 株由来 M24 アミノペプチダーゼ**を組み合わせ、アレルゲンペプチドに対する分解能力を評価する。

【方法および結果】
ウシ由来カゼインのトリプシン消化物に含まれる 2 種の苦味およびアレルゲンペプチド（VLPVPQK および FFVAPFPEVFGK）をモデルに、*S. lividans* 1326 株を宿主として分泌発現したアミノペプチダーゼのペプチド分解能力を評価した。
トリプシン消化物を基質に、M28 アミノペプチダーゼあるいは M1 アミノペプチダーゼと M24 アミノペプチダーゼを併用して作用させた。反応物を分析したところ、VLPVPQK に対して、M1 および M24 の組み合わせが最も効率よく分解し、N 末端から 2 個のアミノ酸が遊離した PVPQK を検出した。一方、FFVAPFPEVFGK に対しては、M1 あるいは M28 と M24 の組み合わせで、いずれも効率よく分解し、おそらく N 末端から 4 個のアミノ酸を遊離できることが判明した。これらの結果から、M24 アミノペプチダーゼとの併用が効果的であった。

【参考文献】*J. Arima, M. Iwabuchi, T. Hatanaka, Biochem. Biophys. Res. Commun. 317(2), 531-538(2004)
**J. Arima, Y.Uesugi, M.Iwabuchi, T. Hatanaka, Protein Eng. Des. Sel. 21(1):45-53(2008)

aminopeptidase, allergenic peptide, *Streptomyces*

発表責任者：畑中唯史（hatanaka@bio-ribs.com）

講演番号：3J34a06
講演日時：3 月 19 日 10:45～ J 校舎 34 会場

*Hypsizygus marmoreus* 由来アミノペプチダーゼに関する研究
Research of aminopeptidase from *Hypsizygus marmoreus*
○大庭 将矢、福田 泰久、白坂 憲章（近大農）
○Masaya OBA, Yasuhisa FUKUTA, Norifumi SHIRASAKA (Kindai Univ.)

【背景と目的】
きのこ類微生物における，栄養菌糸の状態から子実体形成という大きな形態的変化の生化学的なメカニズムは，現在でも未解明のままである．寺下らは，ブナシメジ（*Hypsizygus marmoreus*）の栽培過程におけるプロテアーゼ活性の変動と，プロテアーゼ阻害剤で活性を阻害した際の子実体生育への影響を調べ，子実体の生育に菌体外および菌体内のプロテアーゼ群が重要な役割を果たすことを報告した．本研究では，ブナシメジ培養基への *o*-Phenanthroline 添加による子実体形成への影響，ブナシメジ栽培過程における 6 種のアミノペプチダーゼ群の活性の変動を調べ, *o*-Phenanthroline による阻害を受けるアミノペプチダーゼの精製と遺伝子クローニングを行った．

【材料と方法】
ブナシメジ（NN12 株）のビン栽培過程において，菌まわし終了期に *o*-Phenanthroline（60 mg/bottle）を添加し，菌糸熟成後の子実体形成への影響を確認した．培養期は 20℃，湿度 70%，暗所，栽培期は 15℃，湿度 90%，明所を条件とした．栽培過程中における各アミノペプチダーゼ（AP）活性の経時変化と *o*-Phenanthroline による活性への影響を測定した．各アミノペプチダーゼの基質には Alanine，Glutamic acid，Leucine，Methionine，Proline，Valine の各 *p*-nitroanilide 体を用いた．酵素反応液の組成は，10mM 各基質，0.1M Tris-HCl buffer（pH8.0），水，酵素とし，37℃で 60 分反応させ，遊離する *p*-nitroanilide の発色によって酵素活性を算出した．精製された酵素は PPSQ-31B プロテインシーケンサ−（島津製作所）を用いて N 末端配列を決定し，NN12 株のドラフトゲノムシーケンスデータを基に設計した Primer を用いてクローニングを行った．

【結果と考察】
栽培過程において AlaAP，LeuAP，MetAP，ProAP の活性がみられ，どれもが菌糸熟成に伴い活性の上昇が確認された．また各活性は *o*-Phenanthroline による顕著な阻害を受けた．また，ブナシメジ人工栽培過程における本遺伝子の発現挙動についても報告する．

本研究は，【私立大学戦略的研究基盤形成支援事業（S1512004）】の助成を受けたものである．

*Hypsizygus marmoreus*, aminopeptidase, *o*-Phenanthroline

講演番号：3J34a07
講演日時：3 月 19 日 11:00～ J 校舎 34 会場

# 蛍光性ペプチドを用いたホスホリラーゼキナーゼの高感度活性測定

Sensitive assay of phosphorylase kinase using fluorogenic peptide

○古郷 楽、牧野 泰士、佐藤 正明（大阪府立大学）
○RAKU KOGO, YASUSHI MAKINO, MASAAKI SATO (Osaka Prefecture Univ.)

＜緒言＞

空腹時の体内ではグリコーゲンを分解することでエネルギーを生み出す。この分解を担う酵素の一つとしてグリコーゲンホスホリラーゼ（GP）がある。GP は、ホスホリラーゼキナーゼ（PhK）という酵素により $Ser^{14}$ がリン酸化されることで、不活性型の GPb から活性型の GPa へ変化する。このことから PhK は生体内でのエネルギー代謝における重要な役割を担っていると考えられ、その性質と機能に強い関心が寄せられている。従来 PhK の活性測定法は放射性化合物を用いるものが一般的で、特別な設備が必要になるため容易ではなかった。そこで本研究では蛍光法を用いて、GP の被リン酸化部位周辺 10 アミノ酸残基を有する蛍光性ペプチドを用い、PhK を基質とする簡易な PhK 活性を評価する新しい手法を検討した。

＜結果と考察＞

Tabatabai らは GPb の $Ser^{14}$ 前後 10 残基のアミノ酸配列を有したペプチド（Lys-Arg-Lys-Gln-Ile-Ser-Val-Arg-Gly-Leu）が PhK の基質として有効であることを報告している(1)。本研究ではこのペプチドの N-末端に蛍光基として dansyl 基（5-(dimethylamino)naphathalene-1-sulfonyl 基）を導入し、蛍光検出器を接続した HPLC で反応生成物を分離・定量することとした。なお N-末端に dansyl 基が導入されたペプチドは AnyGen 社によって合成されたものである。この蛍光性ペプチドを PhK と反応させ HPLC で分析したところ、蛍光性を示す dansyl 基を有する新たな物質が生成していることが分かった。この生成物を分取し、アルカリホスファターゼと反応させ HPLC で分析したところ、元の基質に戻ったことが確認された。従って PhK により基質がリン酸化されていたことが分かった。次に、このリン酸化反応の時間変化を調べたところ、時間とともに生成物の生成量が直線的に増加することが分かった。これらの結果より、本研究で開発した手法を用いると PhK の活性測定が可能であることが示された。

(1) Tabatabai, L. B. *et al.* (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 2196－2202

phosphorylase kinase, fluorogenic peptide, allosteric effect

講演番号：3J34a08
講演日時：3 月 19 日 11:15～ J 校舎 34 会場

γ-グルタミル化によるタンパク加水分解物の苦味低減とコク味の付与
Improvement of the taste of protein hydrolyzate by γ-glutamylation.
○中藤 裕子、田村 友規、鈴木 秀之（京都工繊大応生）
○Yuko NAKAFUJI, Tomoki TAMURA, Hideyuki SUZUKI (Kyoto Institute of Technology)

【目的】タンパク加水分解物は、うま味調味料として利用されている。塩酸加水分解によって製造した場合、アミノ酸にまでほぼ完全に分解され、うま味が強く調味料として優れている。しかし、クロロプロパノール類が副生することが分かり、アルカリ分解処理などが行われている。よりマイルドなタンパク質分解法としてプロテアーゼ処理も試みられているが、完全にアミノ酸にまで分解することが難しく、苦味の原因となるペプチドが残存する。当研究室では苦味アミノ酸をγ-グルタミル化すると苦味が激減すること[1)]、味噌醪にγ-グルタミルトランスペプチダーゼ(GGT)を添加するとコク味物質であるγ-Glu-Val やγ-Glu-Val-Gly の濃度が上昇すること[2)] を示した。さらに、大豆タンパク質のプロテアーゼ加水分解物にグルタミンと *Bacillus amyloliquefaciens* 由来のグルタミナーゼを添加することにより、加水分解物に含まれていたペプチドをγ-グルタミル化して呈味性を改善できるばかりでなく。コク味を呈するようになることを報告した[3)]。これは優れた方法であったが、γ−グルタミル基供与体として決して安価でないグルタミンを必要とするという問題点があった。小麦グルテンは分子内に極めて多くのグルタミン残基を持つことから、グルテンのプロテアーゼ加水分解物はグルタミンを多く含み、そこにグルタミナーゼを作用させれば、多くのγ−グルタミルペプチドが生成すると予想し、実験を行った。
【方法と結果】食品添加物として市販されている *B. amyloliquefaciens* 由来のグルタミナーゼは、γ-Glu-*p*-NA と Gly-Gly からγ-Glu-Gly-Gly を生成する転移反応を触媒したので、この酵素剤を GGT として用いた。グルテンを食品添加物として市販されている *B. licheniformis* 由来のプロテアーゼを用いて pH 9.0 で分解し、グルタミンを 4 mM 含むタンパク加水分解物を得た。このタンパク加水分解物溶液に *B. amyloliquefaciens* 由来のグルタミナーゼを pH 10.0 で反応させた。グルタミナーゼを反応させる前後の溶液を HPLC で分析したところ、転移反応により生成したと考えられるγ-グルタミルペプチドと予想されるピークが出現した。次に、大腸菌 GGT を加水分解反応のみが起こる pH 5.5 で反応させたところ、γ-グルタミルペプチドと考えられたピークが消失し、グルタミン酸が蓄積したことを確認した。このことから、グルテンを出発タンパク質とすれば、γ-グルタミル基供与体としてグルタミンを添加する必要がないことが明らかとなった。
Ref. 1) Suzuki *et al.* **J. Agric. Food Chem.** *50*:313-318 (2002); 2) Ho and Suzuki. **Int. J. Food Studies** *2*:39-47 (2013); 3) 田村、鈴木. 日本農芸化学大会要旨集 4A14a13 (2014).

γ-Glutamyltranspeptidase, Glutaminase, Gluten

発表責任者：鈴木秀之（hideyuki@kit.ac.jp）

講演番号：3J34a09
講演日時：3 月 19 日 11:30～ J 校舎 34 会場

好熱好酸性アーキア *Sulfolobus tokodaii* に存在する 2 種類の色素依存性 D-乳酸脱水素酵素の機能解析
Characterization of two dye-linked D-lactate dehydrogenases from a thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus tokodaii*.

○里村 武範[1,2]、角間 真人[1]、黒沢 則夫[5]、櫻庭 春彦[3]、大島 敏久[4]、末 信一朗[1,2] ([1]福井大院工、[2]福井大ライフ、[3]香川大農、[4]大阪工大工、[5]創価大)
○Takenori SATOMURA[1,2], Masato KAKUMA[1], Norio KUROSAWA[5], Haruhiko SAKURABA[3], Toshihisa OHSHIMA[4], Shin-ichiro SUYE[1,2] ([1]Univ. Fukui, [2]Life Sci. Univ. Fukui, [3]Kagawa Univ., [4]Osaka Inst. Tech, [5]Souka Univ.)

[背景・目的]

色素依存性 D-乳酸脱水素酵素（Dye-DLDH）は 2,6-ジクロロインドフェノール(DCIP)のような人工酸化還元色素存在下で D-乳酸の酸化反応を触媒する FAD 含有酵素である。色素依存性脱水素酵素は生体内では電子伝達系の初発酵素として細胞内のエネルギー生産に重要な役割を果たしている。我々は、これまでに好熱好酸性アーキア *Sulfolobus tokodaii* に Dye-DLDH を見出し、詳細な酵素化学的性質と酵素をコードしている遺伝子 STK_06490 の同定に成功している（1)。*S. tokodaii* ゲノムを詳細に解析した結果、STK_06490 遺伝子以外に別の Dye-DLDH ホモログ遺伝子 STK22950 を見出した。STK22950 遺伝子は *S. tokodaii* ゲノム上で STK_22940 遺伝子と一部遺伝子を共有しており遺伝子クラスターを形成していた。本研究では本遺伝子発現産物の機能同定と酵素化学的特徴を明らかにし、Dye-DLDH の *S. tokodaii* 生体内での生理機能を解明することを目的として研究を行った。

[実験方法および結果]

*S. tokodaii* よりゲノム DNA を鋳型として STK_22950-22940 遺伝子クラスターを PCR 法によって増幅した。この遺伝子断片を *Sulfolobus*-大腸菌シャトルベクターである pSAVex ベクターに導入し、タンパク質発現用ベクター pSAVex-STK_22950-22940 を作製した。pSAVex-STK_22950-22940 を *S. acidocaldarius* SK1 株(2)にエレクトロポレーションにより導入した。組み換えタンパク質を *S. acidocaldarius* SK1 株内で発現させた後、菌体破砕し組換えタンパク質の精製を行った。その結果、精製タンパク質は Dye-DLDH 活性を有していた。しかしながら、精製酵素は安定性が低く、長期間常温で保存しておくと Dye-DLDH 活性が徐々に低下していった。同じ Dye-DLDH 活性を有する STK_06490 遺伝子発現産物にはこのような現象は認められなかった。現在、STK_22950 遺伝子発現産物のさらに詳細な機能解析を進め Dye-DLDH の生理機能の解析を進めている。

1. Satomura T, Kawakami R, Sakuraba H, Ohshima T. *J. Biosci. Bioeng*. 106, 16-21 (2008)
2. Suzuki S, Kurosawa N. *Extremophiles* 20, 139-148 (2016)

Archaea, Thermophile, Dye-linked dehydrogenase

発表責任者：里村武範（satomura@u-fukui.ac.jp）

講演番号：3J34p01
講演日時：3 月 19 日 14:00～ J 校舎 34 会場

# L-メチオニン脱炭酸酵素を用いた新規 L-メチオニン定量法の開発

# Development of a novel method for L-methionine determination using L-methionine decarboxylase

○林 将也[1]、根本 理子[1]、稲垣 純子[2]、菊池 可菜子[3]、木村 隆[3]、田村 隆[1]、稲垣 賢二[1]([1]岡山大院・環境生命、[2]岡山大院・医歯薬、[3]ニプロ（株）・酵素センター)
○Masaya HAYASHI[1], Michiko NEMOTO[1], Junko INAGAKI[2], Kanako KIKUCHI[3], Takashi KIMURA[3], Takashi TAMURA[1], Kenji INAGAKI[1] ([1]Grad. Sch. of Environ. Life Sci., Okayama Univ., [2]Okayama Univ. Grad. Sch. of Med. Dent. Pharma.,, [3]Enzyme Center, NIPRO Co. Ltd.)

**【目的】**必須アミノ酸 L-メチオニン（L-Met）の血中濃度は通常，低値で一定に保たれている（13.5-36.8 μM)。血中 L-Met が高値（1.5-20 mM）の場合は，先天性メチオニン代謝異常症の他，心筋梗塞や脳梗塞，認知症あるいは骨粗鬆症などの生活習慣病を含む疾病の可能性が考えられる。L-Met の酵素的定量法としては，ビタミン $B_6$ 酵素 L-メチオニン γ-リアーゼ（MGL）や変異型フェニルアラニン脱水素酵素が考案されているが，副反応が起こるあるいは分岐鎖アミノ酸の影響を受ける等の問題点が指摘されている。ビタミン $B_6$ 酵素の L-メチオニン脱炭酸酵素（MetDC）は，L-Met の脱炭酸を触媒して 3-メチルチオプロピルアミン及び $CO_2$ を生じる。我々はこれまでに放線菌 *Streptomyces* sp. 590 由来 MetDC の遺伝子クローニング，組換え発現，精製と性質について報告した[1)]。本研究の目的は，MetDC を用いた L-Met の酵素的定量法を確立し，多検体からの簡便・迅速・正確な定量を可能とすることである。**【方法】***metdc* 遺伝子を放線菌ゲノムからクローニングし pET-52b ベクターを用いて発現プラスミドを構築し，*E. coli* BL21(DE3)に導入した。組換え MetDC は，菌体粗酵素液からアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。酵素活性は，アミン酸化酵素とペルオキシダーゼを併用した 4-アミノアンチピリン法により行った。

**【結果及び考察】**これまで用いてきた反応条件（リン酸カリウム緩衝液，pH 6.6）では，MetDC を用いて L-Met を 0.25-7.5 mM（55℃, 5 min），5-50 μM（37℃, 30 min）の範囲で定量できた。ただし，吸光度の検出値が理論値よりも低かったため，緩衝液・pH を検討した。その結果，Tris-HCl 緩衝液（pH 8）により L-Met は高感度で検出され，定量可能な L-Met 濃度範囲が拡大した。その理由として，緩衝液種と pH の変更により呈色反応に関わるペルオキシダーゼの活性が向上したことが挙げられる[2)]。また，従来型の 2 段階法では MetDC 反応 37℃，30 min・呈色反応 37℃，60 min（L-Met：1-500 μM）を要し，新しく検討した 1 段階法では 37℃，10 min（L-Met：1-50 μM）と所要時間を大幅に短縮できた。さらに本法は，5 あるいは 10%血漿を含むサンプルに添加した L-Met 濃度のわずかな変化を感度よく検出できた（L-Met：5-50 μM)。以上より本定量法は，既知の L-Met の酵素的定量法と比べて，副反応がみられず，血漿に含まれる未知成分の影響を受けにくいというメリットがあることがわかった。現在，血漿や血清中の L-Met の定量性を，確認中である。

1) Hayashi, M. *et al.*: *J. Biochem.*, doi: 10.1093/jb/mvw083 (2016).
2) Asad, S. *et al.*: *Int. J. Biol. Macromol.*, **48**, 566-570 (2011).

L-methionine determination, L-methionine decarboxylase, analytical method

発表責任者：稲垣　賢二（kinagaki@okayama-u.ac.jp）

講演番号：3J34p02
講演日時：3 月 19 日 14:15～ J 校舎 34 会場

糸状菌由来の抗腫瘍性酵素 L-リシンα-オキシダーゼの大腸菌発現・精製系の構築
Construction of recombinant expression and purification system of antitumor enzyme L-lysine α-oxidase from *Trichoderma viride* in *Escherichia coli*

○松本 侑也[1]、天野 万里[1]、根本 理子[1]、稲垣 純子[2]、田村 隆[1]、日下部 均[3]、稲垣 賢二[1]([1]岡山大院・環境生命、[2]岡山大院・医歯薬、[3]（株）エンザイム・センサ)
○Yuya Matsumoto[1], Marie Amano[1], Michiko Nemoto[1], Junko Inagaki[2], Takashi Tamura[1], Hitoshi Kusakabe[3], Kenji Inagaki[1] ([1]Grad. Sch. Environ. & Life Sci., Okayama Univ., [2]Okayama Univ. Grad. Sch. Med. Sci. Dental. & Pharam., [3]Enzyme Sensor Co. Ltd.)

【目的】糸状菌 *Trichoderma viride* 由来 L-リシン α-オキシダーゼ(LysOX)は，L-アミノ酸オキシダーゼ(LAO)の一種であり, L-リシンの酸化的脱アミノ化反応を触媒するフラビン酵素である。LAO は一般的に基質特異性が低いものが多い中, 本酵素は L-リシンに対して高い基質特異性を持ち，温度や pH に対しても安定であることから食品工業分野においてバイオセンサーとして利用されている。また, LysOX は強力な抗腫瘍性を有しており，がん治療への応用も期待されている。しかし，糸状菌 *T. viride* での生産，精製が困難であるため，長年遺伝子クローニングと大量発現系の構築が求められていた。我々は，LysOX 完全長 cDNA の取得と放線菌を用いた組換え発現系の構築に成功し，2015 年の本大会で発表した[1]。今回は大腸菌宿主での発現系と精製系の構築に成功し，プレ LysOX(LysOX 前駆体)の性質を明らかにしたので報告する。
【方法】大腸菌で発現系の構築を行う際，LysOX 塩基配列には大腸菌では見られないレアコドンが多く含まれるため，大腸菌用にコドンの最適化を行い，これを発現用プラスミドベクターに挿入した。そして宿主大腸菌を形質転換し，LysOX を発現させた。発現したプレ LysOX を Butyl-トヨパールおよび DEAE-トヨパール等のカラムを用いて精製した。 LysOX の活性測定は MBTH 法を用いて行い，抗腫瘍性は顕微鏡での確認と MTS アッセイ法を用いて検討した。
【結果及び考察】*T. viride* 由来 LysOX のプレ配列を含む完全長 cDNA を LysOX 発現用宿主として *E. coli* BL21(DE3)，発現用ベクターとして pCold ベクターを用いて導入して LysOX を発現させた際にプレ LysOX の発現が確認された（比活性 2.2 U/mg）。精製したプレ LysOX の性質検討を行ったところ, 50℃, 30 分間の熱処理で 40%程の残存活性となり，熱に不安定であったが, 基質特異性は *T. viride* から精製した酵素と同様であった。また，精製したプレ LysOX を各種プロテアーゼで処理したところ，トリプシン処理で 89.0U/mg，キモトリプシン処理で 63.3U/mg，SGP 処理で 141.0U/mg と未処理の時と比べて 70 倍近い比活性の上昇が確認された。プレ LysOX とプロテアーゼ処理した LysOX を用いてヒト腫瘍細胞である A431（ヒト扁平上皮癌細胞株）及び MDA-MB-231（ヒト乳腺細胞株）に対する細胞毒性を検討したところ，LysOX 前駆体，成熟体ともに 10 mU/ml の濃度で腫瘍細胞に添加した際に両がん細胞に対して顕著な細胞毒性が確認された。

1) Amano M., Inagaki K. *et al., J. Biochem.*, **157**, 549-559 (2015).

L-Lysine α-oxidase, antitumor enzyme, recombinant expression

発表責任者：稲垣賢二（kinagaki@okayama-u.ac.jp）

講演番号：3J34p03
講演日時：3 月 19 日 14:30～ J 校舎 34 会場

# Transcriptomic analysis of cordycepin biosynthesis pathway between in liquid surface culture and submerges culture using *Cordyceps militaris*

○Suparmin Ahmad[1], Tatsuya Kato[1,2], Hideo Dora[3], Enoch Y. Park[1,2] ([1]Fac. Agric., Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ., [3]Ins. Res. Support Office Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

**Objective:** The conventional fermentation process carried out by submerged culture (SMC). However, cordycepin production in SMC by *Cordyceps militaris* was very low compared to liquid surface culture (LSC). Here, we investigated the metabolic difference in its cordycepin biosynthesis between SMC and LSC.

**Methods and Results:** Cordycepin concentrations in LSC and SMC were 4.92 g/L at 15$^{th}$ d and 1.1 g/L at 21$^{st}$ d, respectively. Transcriptomic analysis revealed a significant difference expression. A putative annotation showed that cordycepin was synthesized via De Novo pathway as well as purine biosynthesis. Adenylosuccinate synthetase (XP_006672557.1) was expressed more than 9-fold in LSC. This protein plays a role to synthesize adenosine monophosphate (AMP), which subsequently converted from inosine monophosphate (IMP). AMP was dephosphorylated to adenosine to produce cordycepin by 5'-nucleotidase (XP_006665845.1), suggesting that AMP should be a precursor for cordycepin synthesis. In addition, some protein responds to hypoxia condition also expressed only in LSC, indicating that hypoxia condition induced the cordycepin synthesis. To date, this is the first study of transcriptomic analysis for cordycepin production in LSC using a wild-type strain.

cordycepin, *Cordyceps militaris*, biosynthesis

発表責任者：Ahmad Suparmin（suparmin.micro@gmail.com）

講演番号：3J34p04
講演日時：3 月 19 日 14:45～ J 校舎 34 会場

タンパク質一次構造に基づく新たなインシリコ酵素探索法, INTMSAlign_Angler の開発
Development of new in silico enzyme screening method, INTMSAlign_Angler, based on protein primary structure

○中野 祥吾[1,3]、本山 智晴[1]、篠田 優[2,3]、伊藤 創平[1,3]、浅野 泰久[2,3]（[1]静岡県大・食栄、[2]富山県大工・生工研セ、[3]JST, ERATO）
○Shogo Nakano[1,3], Tomoharu Motoyama[1], Suguru Shinoda[2,3], Sohei Ito[1,3], Yasuhisa Asano[2,3]
([1]Univ. of Shizuoka, [2]Toyama Pref. Univ., [3]JST, ERATO)

［研究の目的］次世代シーケンサーなどの塩基配列解析技術の進歩により、様々な属種由来の酵素アミノ酸配列がデータベースに登録されるようになった。同時に膨大なデータの中から有用酵素を抽出する手法（インシリコ酵素探索法）の開発が求められている。幾つかの成功例が報告されているが、酵素の立体構造情報を必要とする手法が殆どである。本研究では機能既知の酵素アミノ酸一次構造だけを使用し、データベース上から有用酵素を探索する手法の開発を目的とした。
［方法］インシリコ酵素探索法の開発には、発表者らが開発したタンパク質アミノ酸配列解析ソフトウェア、INTMSAlign を用いた（1)。インシリコ探索法開発のため、“相関振動残基（CF 残基)”を本研究にて新たに定義した。CF 残基は、様々なファミリータンパク質のアミノ酸配列の組み合わせからなるデータを INTMSAlign で解析することで探索され、異なるファミリータンパク質との組み合わせにおいてアラインメントを行った場合でも、アミノ酸保存性度が高い相関を以て変動する残基対を指す。鋳型となる機能既知の酵素と、同様の CF 残基を持つアミノ酸配列をデータベースから取得することで、インシリコ酵素探索が可能となると考えた。本手法の妥当性を評価するため、2 つの異なる酵素、*Cupriavidus necator* 由来 L-スレオニン脱水素酵素（CnTDH）(2）と *Pseudomonas* sp. TPU 7192 由来 L-アルギニン酸化酵素（PtAROD）を鋳型として、これら酵素群のインシリコ探索を行った。
［結果と考察］まず CnTDH の結果について示す。CnTDH の配列解析を行い、CF 残基を 143(V):174(L), 188(Y):214(M)と予測した。この表記は、CnTDH の CF 残基が 143 と 174, 188 と 214 の 2 つの残基対で構成されており、かつ CnTDH においてこれらの残基が Val, Leu, Tyr 及び Met であることを示している。次に探索した CF 残基を持つ配列を、配列データベースから抽出し、約 90 個の TDH 候補配列を得た。これらの配列のうち、CnTDH と 40 ～ 60%の配列相同性を持つ 9 つについて酵素化学解析を行い、全て TDH 活性を持つことを確認した。同様に PtAROD について配列解析を行い、CF 残基を 15(G):50(S), 383(C):587(I)と予測したのち、データベースから配列を抽出し、10 個の AROD 候補配列を得た。これらの配列のうち、PtAROD と 60% ～ 80%の相同性を持つ 2 つについて酵素化学解析を行い、AROD 活性を保持することを確認した。以上の結果から、開発したインシリコ酵素探索法が新しいアミノ酸配列を持つ目的酵素の取得に有効であると結論した。

(1), S. Nakano and Y. Asano, *Sci. rep.*, 2015, **5**, 8193
(2), S. Nakano et al., *J. Biol. Chem.*, 2014, **289**, 10445-10454

In silico enzyme screening, amino acid dehydrogenase/oxidase, Software development

発表責任者：中野 祥吾（snakano@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：3J34p05
講演日時：3 月 19 日 15:00～ J 校舎 34 会場

# 人工設計型配列データベース由来 L－スレオニン脱水素酵素の機能解析

# Functional analysis of artificially designed L-threonine dehydrogenase from sequence database

○本山 智晴[1]、中野 祥吾[1,3]、松永 玲実[1]、浅野 泰久[2,3]、伊藤 創平[1,3]([1]静岡県大・食栄、[2]富山県大工・生工研セ、[3]JST, ERATO)
○Tomoharu MOTOYAMA[1], Shogo NAKANO[1,3], Remi MATSUNAGA[1], Yasuhisa ASANO[2,3], Sohei ITO[1,3] ([1]Univ. of Shizuoka, [2]Toyama Pref. Univ., [3]JST, ERATO)

［目的］
L-スレオニン脱水素酵素（TDH）は L-スレオニン（L-Thr）に対して高い特異性を示す（1)。TDH はその高い特異性を生かし、様々なサンプル中における L-Thr の定量に利用され、TDH とその他アミノ酸脱水素酵素は血中アミノ酸濃度の定量による健康診断などの技術に応用が期待されている。しかし、TDH は既存の変異導入法を用いて機能変換を行うことが難しいためか、現在のところ、基質特異性などの性質を改変することはできていない。本研究では、自然界に存在する TDH よりも活性が強く、安定な TDH を設計し、TDH の更なる応用研究の可能性を広げることを目指し研究を行った。
［方法］
これまでに報告されている TDH である *Cupriavidas necator* 由来 TDH（*Cn*TDH）のアミノ酸一次配列を鋳型として独自に開発したソフトウェア INTMSAlign を用い（2)、約 90 個の TDH 候補配列を絞り込みライブラリとした。その後ライブラリを用い、すべての残基がコンセンサス残基から成る完全コンセンサス TDH（*Fc*TDH）を設計した。*Fc*TDH の発現、精製を行ったのち、本酵素の各種酵素化学的機能解析を行った。
［結果・考察］
*Fc*TDH は、*Cn*TDH や他の TDH と同様に L-Thr に対して高い特異性を示した。また、*Cn*TDH と比べて、熱安定性が約 20℃上昇し、$k_{cat}/K_m$ 値も上昇した。従来、完全コンセンサスタンパク質は熱安定性を向上させるが反応速度は減少する例が報告されていたが、*Fc*TDH は熱安定性、反応速度の両方が上昇した。*Fc*TDH と最も類似したタンパク質とのアミノ酸一次配列の相同性は 79%であり、*Fc*TDH は自然界に存在しない配列を有した新規な酵素であり、*Cn*TDH よりも優れた特性を有した。本発表では、*Fc*TDH の設計方法、機能解析の詳細について報告するとともに、完全コンセンサス設計法を用いることでの新たなスクリーニング方法の可能性についても述べる。
［参考文献］
(1) T. Kazuoka *et al.*, *J. Bacteriol.*, **185**, 4483-4489 (2003).
(2) S. Nakano *et al.*, *Sci. rep.*, **5**, 8193 (2015).

L-threonine dehydrogenase, artificial protein, full consensus protein design

発表責任者：中野祥吾（snakano@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：3J34p06
講演日時：3 月 19 日 15:25～ J 校舎 34 会場

超好熱性細菌 *Thermotoga maritima* 由来アスパラギン酸キナーゼ/ホモセリンデヒドロゲナーゼ融合酵素(AK/HseDH)の機能解析
Functional analysis of aspartate kinase/homoserine dehydrogenase bifunctional enzyme from hyperthermophilic bacterion, *Thermotoga maritima*.
○古場 康平[1]、林 順司[1]、安部 展洋[1]、米田 一成[2]、大島 敏久[3]、櫻庭 春彦[1] ([1]香川大農、[2]東海大農、[3]大工大工)
○Kohei KOBA[1], Junji HAYASHI[1], Nobuhiro ABE[1], Kazunari YONEDA[2], Toshihisa OHSHIMA[3], Haruhiko SAKURABA[1] ([1]kagawa Univ., [2]Tokai Univ., [3]Osaka Inst. Tech.)

**【背景】**必須アミノ酸であるイソロイシン(Ile)、メチオニン(Met)、スレオニン(Thr)は、微生物や植物にのみ存在するアスパラギン酸経路によってアスパラギン酸(Asp)から生合成される。本経路ではまず、Asp がアスパラギン酸キナーゼ(AK)により、β–アスパルチルリン酸(β-AP)へ変換され、次いでアスパラギン酸セミアルデヒド脱水素酵素 (AsaDH)が β-AP をアスパラギン酸セミアルデヒド(Asa)へと変換する。Asa はホモセリン脱水素酵素 (HseDH)によって Ile、Met、Thr の前駆体であるホモセリン(Hse)へと変換される。AK と HseDH はそれぞれ単独で存在する例もあるが、植物、細菌、アーキアなどでは融合し 2 機能性の酵素(AK/HseDH)として働くものが多い。AK/HseDH は幅広い生物種で研究がなされているが超好熱菌では全く報告がなく、さらに AK/HseDH の立体構造はどの生物由来のものでも未だに解析されていない。また、β-AP と Asa は非常に不安定な物質であり、AsaDH が AK/HseDH と複合体を形成することで基質をスムーズに受け渡す基質伝達機構の存在が示唆されているが、これを証明する報告はない。我々は、超好熱性細菌 *Thermotoga maritima* に AK/HseDH のホモログをコードする遺伝子 TM0547 を見出した。本研究では *T. maritima* AK/HseDH の機能、構造解析を行うとともに、AK/HseDH と AsaDH の複合体形成の可能性を探ることを目的とする。
**【結果】**TM0547 の大腸菌における発現系を構築し、発現産物を 85℃、10 分間の熱処理、Ether-650M、Superdex200、cellfine HAP で精製した結果、精製酵素は AK 及び HseDH 活性を示した。これは超好熱菌に AK/HseDH が存在すること示した初の例である。本酵素の酵素化学的諸性質を求めた結果、AK 反応の最適 pH は 7.2、最適温度は 50℃以上、Asp に対する Km は 8.68 mM、Vmax は 8.29 μmol/min/mg、ATP に対する Km は 1.74 mM、Vmax は 10.6 μmol/min/mg であった。一方、HseDH 反応の最適 pH は 10.5、最適温度は 70℃以上、Hse に対する Km は 2.56 mM、Vmax は 26.7 μmol/min/mg、NADP に対する Km は 0.205 mM、Vmax は 31.6 μmol/min/mg であった。本酵素は 90℃、10 分間処理でも活性を保持し、50℃では pH 5.5~10.5 の範囲で安定であった。また、本酵素の AK 反応は Thr により強力に阻害されることが判明した。現在、本酵素の結晶化、及び AsaDH との複合体形成に関して検討中である。

*Thermotoga maritima*, Aspartate kinase, Homoserine dehydrogenase

講演番号：3J34p07
講演日時：3 月 19 日 15:40～ J 校舎 34 会場

糸状菌 Z26-4-8 株が産生するタンパク質酸化能を有するアミノ酸オキシダーゼの諸性質解明
Characterization of an amino acid oxidase with protein-oxidizing activity from fungal strain Z-26-4-8
○土屋 高伸、山田 美和、下飯 仁、礒部 公安 (岩大農)
○Takanobu TSUCHIYA, Miwa YAMADA, Hitoshi SIMOI, Kimiyasu ISOBE (Iwate Univ.)

【目的】我々は、タンパク質中のアミノ基を酸化する酵素が、タンパク質の物性改良へ応用できると期待して、タンパク質を酸化するオキシダーゼ産生微生物を探索し、新規な *Penicillium steckii* AIU 027 由来 L-アミノ酸オキシダーゼ(PsAAO)を見出した[1]。最近我々は、研究室保有の糸状菌 Z26-4-8 株から、新たにタンパク質を酸化するオキシダーゼを精製し、酵素化学的性質、物理化学的性質、N 末端アミノ酸配列等を明らかにした。その結果、本酵素は PsAAO と類似する性質を有するが、基質特異性が異なる新規酵素と推定された。そこで、本研究では、酵素の反応様式および多様な基質に対する反応動力学定数を求め、本酵素の性質を詳細に解明することを目的とした。
【方法・結果】酵素は、L-リシン培地(80 L)で 30℃、2 日間培養した菌体から粗酵素液を調製し、4 段階のカラムクロマトグラフィーで精製した。酵素活性は、オキシダーゼ反応で生成する過酸化水素を比色法(555 nm)によって測定した。まず、本酵素の反応様式を決定するために、β-ラクトグロブリンもしくは $N^{\alpha}$-Z-L-リシンを基質とし、精製酵素 1.5 munit と 30℃ で 30 分間インキュベートして反応生成物と予想される過酸化水素およびアンモニアの生成量を測定した。過酸化水素は、酵素活性と同様の比色法、アンモニアは、アンモニアテストキットワコーを用いて定量した。その結果、反応液中の過酸化水素：アンモニアはほぼ 1：1 であり、本酵素は、酸化的脱アミノ化反応を触媒していることが明らかになった。次に、タンパク質、ペプチド (3 種)、L-アミノ酸 (7 種)、α位もしくはε位アミノ基を修飾した L-リシン誘導体 (4 種)、D-アミノ酸(4 種)、およびアミン (1 種) に対する反応動力学定数を求めた。その結果、本酵素は低分子量ペプチドほど高い親和性を示したが、その親和性は、分子量よりもタンパク質、ペプチド中のアミノ酸組成に影響されることが示唆された。また、本酵素のタンパク質、ペプチドに対する最大反応速度は、PsAAO よりも約 4～10 倍程度高かった。さらに本酵素は、L-リシン誘導体では、PsAAO と同様にε位よりもα位のアミノ基に親和性が高かったが、これまでの報告されているタンパク質を酸化する酵素とは異なり、D-アミノ酸も酸化した。よって、本酵素は、既知のタンパク質を酸化する酵素と同様にアミノ基の酸化的脱アミノ化反応を触媒するが、基質特異性や反応動力学定数が既知酵素と大きく異なり、新規酵素であることが明らかになった。
[1] K. Isobe et al., Journal of Bioscience and Bioengineering, 117, 690-695 (2014)

Amino acid oxidase, Protein oxidase, Peptide

講演番号：3J34p08
講演日時：3 月 19 日 15:55～ J 校舎 34 会場

ヒト腸内細菌優占種の芳香族アミン生成能および大腸菌を用いた異種発現による芳香族アミノ酸脱炭酸酵素（AADC）ホモログの性状解明

Production of aromatic amines by dominant species of enteric bacteria and characterization of their aromatic amino acid decarboxylase (AADC) homologues by heterologous expression in *Escherichia coli*

杉山 友太[2]、○河田 明輝[1]、奈良 未沙希[2]、小柳 喬[1]、片山 高嶺[2,3]、栗原 新[2]（[1]石川県大・生資環・食品、[2]石川県大・腸内細菌、[3]京大院・生命）

Yuta SUGIYAMA[2], ○ Hiroki KAWADA[1], Misaki NARA[2], Takashi KOYANAGI[1], Takane KATAYAMA[2,3], Shin KURIHARA[2] ([1]Dept. Food Sci., Ishikawa Pref. Univ., [2]Host-Microbe Interact. Res. Lab., Ishikawa Pref. Univ., [3]Grad. Sch. Biostudies, Kyoto Univ.)

【背景・目的】ヒト腸内細菌は約 1000 種 100 兆個以上といわれる細菌叢を形成しており、それぞれの菌種が持つバラエティーに富む代謝機能により生産される代謝産物は、腸内細菌菌体（ホストの防御機構に阻まれ組織内へはごく一部しか到達できない）と比較して、より直接的にホストの健康・疾病に関連していると考えられる。大腸腸管内腔に存在する芳香族アミンは抹消神経伝達、蠕動運動、生体調節等の生理活性を有する重要な腸内細菌の代謝産物であるが、その生産機構についてはほとんど解明されていない。我々はヒト腸内細菌優占種 56 種（Qin et al., *Nature*, 2010, **464**:59–65）のうち、GAM 培地で培養可能な 32 種の芳香族アミン産生菌種の探索を行い、芳香族アミノ酸（Phe、Tyr、Trp）を脱炭酸し、フェネチルアミン（PEA）、チラミン（TYM）、トリプタミン（TPM）を培養上清中に放出する 5 菌種（*Clostridium asparagiforme, C. nexile, Ruminococcus gnavus, Enterococcus faecalis, Blautia hansenii*）を見出した。この芳香族アミノ酸の脱炭酸能は、各菌種が持つ芳香族アミノ酸脱炭酸酵素（AADC）ホモログによると考えられた。本研究では、腸内細菌最優勢種の遺伝子調節を通じた腸管内芳香族アミン濃度の最適化のための基礎科学的基盤の構築を目指し、各菌種の AADC ホモログ遺伝子を導入した大腸菌を用いて芳香族アミンの生産機構の解析を行った。

【実験方法・結果】上記 5 菌種について GAM 液体培地を用いて 37℃にて嫌気培養を行い、培養上清中の PEA、TYM、TPM の濃度を HPLC により測定した。その結果、各芳香族アミンについて菌種毎に生成量に違いがあり、AADC の基質特異性の相違が伺われた。そこで、各菌の AADC ホモログを大腸菌用発現ベクター（pCDF23b）上にクローニングして大腸菌 BL21 (DE3) に導入し、取得した形質転換体を Phe、Tyr、Trp を終濃度 1 mM で添加した M9 最少培地にて培養し、IPTG 誘導により異種発現における培養上清中の各種芳香族アミン生産を解析した。培養上清中で生産された PEA、TYM、TPM 濃度、および対応するそれぞれの芳香族アミノ酸（Phe、Tyr、Trp）の残存濃度を定量した結果、*C. asparagiforme, C. nexile, R. gnavus* の AADC ホモログを導入した株においては、添加したすべての芳香族アミノ酸の減少および芳香族アミン類の顕著な生成が確認された。これに対して、*E. faecalis* の AADC ホモログ導入株においては Tyr から TYM への転換が優先的に起こり、Phe については一部が PEA に転換されたが、Trp から TPM への転換は起こらなかった。本結果より、腸内細菌優勢種の芳香族アミン生成能は菌種ごとに異なっており、複数の菌種の存在バランスにより腸管内濃度が調節されていることが示唆された。

aromatic amino acid decarboxylase, aromatic amines, enteric bacteria

発表責任者：栗原新（kuri711@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：3J34p09
講演日時：3 月 19 日 16:10～ J 校舎 34 会場

好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来のリジン生合成系酵素 LysK とキャリアタンパク質 LysW の相互作用機構に関する研究
Study on interaction of the lysine biosynthetic enzyme LysK with a career protein LysW in *Thermus thermophilus*
○藤田 理美、長谷部 文人、CHO Su-Hee、富田 武郎、葛山 智久、西山 真（東大・生物工学セ）
○Satomi FUJITA, Fumihito HASEBE, Su-Hee CHO, Takeo TOMITA, Tomohisa KUZUYAMA, Makoto NISHIYAMA (BRC, UTokyo)

*Thermus thermophilus* のリジン生合成経路(AAA 経路)はアルギニン生合成経路と類似しているが、アルギニン生合成では生合成中間体のアミノ基をアセチル基で保護するのに対し、AAA 経路ではキャリアタンパク質 LysW を用いてアミノ基の保護を行う。まず LysX により AAA のアミノ基に LysW が結合し、その後 LysW-AAA は LysZ、LysY、LysJ による変換を受け、LysW-Lys となる。LysW-Lys は LysK により加水分解され、LysW とリジンが生成する。これまでに結晶構造が決定されている AAA 経路酵素群は、アルギニン生合成酵素群には存在しない、正に帯電した領域を活性中心付近の分子表面に持ち、負に帯電した LysW をこの領域が認識することが解明されてきている。このことから、LysW は中間体保護のみならず、酵素の基質認識効率を高める役割を担い、基質受け渡し機構に関わると予想されている。LysX、LysZ、LysY では LysW 複合体結晶構造が決定され LysW 認識機構が解明されつつあり、LysJ についても単体結晶構造が決定されているが、LysK は単体の結晶構造も決定されていなかった。前々回の本大会で LysK の結晶構造を 2.4 Å 分解能で決定し、その構造を基に変異体を作製して LysK による LysW 認識部位を探索した成果を発表した。しかし LysK 上の各アミノ酸の寄与を定量的に評価するまでには至っていなかったため、今回は LysW-Lys、LysW の C 末端 10 アミノ酸残基と Lys が結合した CT10-Lys ペプチドを基質として、反応速度論的解析を行った。

LysW-Lys は 44 残基の負に帯電した球状ドメインと C 末端 10 残基の伸長ドメインに Lys が付加したものである。LysK の正電荷に寄与する残基のうち、球状ドメインを認識する残基の特定を行った。LysW-Lys、CT10-Lys それぞれに対する活性測定を行ったが、いずれも基質濃度が飽和しなかったため、$k_{cat}/K_m$ で比較をした。LysW-Lys に対する $k_{cat}/K_m$ は野生型と比べて変異体 R282E、R286E、K297E で低下した。一方、CT10-Lys に対する $k_{cat}/K_m$ は、R282E、R286E では野生型と比べてあまり変化がなかったが、K297E では低下した。$k_{cat}/K_m$ が低下したいずれの場合も基質濃度の上昇により反応速度の増加が認められることから、各変異により $K_m$ が大幅に上昇していると判断した。以上から、R282、R286 は LysW-Lys の球状ドメインを、K297 は C 末端伸長ドメインを認識することが明らかとなった。さらに、この結果を基に LysK-LysW 複合体モデル構造を作製し、活性測定結果と一致する構造が立体障害なく得られることを確認した。今回の成果は、AAA 経路で唯一構造が未決定であった LysK の LysW 認識機構の一端を解明した。全酵素の構造が明らかとなったことから、酵素間での基質受け渡し機構の解明につながることが期待される。

*Thermus thermophilus*, lysine biosynthesis, crystal structure

発表責任者：西山真（umanis@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3J34p10
講演日時：3 月 19 日 16:25～ J 校舎 34 会場

Sphingobium sp. SYK-6 株の O-demethylase LigM の研究
Study of O-demethylase LigM from Sphingobium sp. strain SYK-6
○于 宏洋[1,2]、原田 彩佳[2]、上村 直史[3]、政井 英司[3]、千田 俊哉[1,2] ([1]総研大、[2]高エネ機構　構造生物、[3]長岡技大)
○ Hongyang YU[1,2], Ayaka HARADA[2], Naofumi KAMIMURA[3], Eiji MASAI[3], Toshiya SENDA[1,2] ([1]SOKENDAI Univ., [2]KEK SBRC, [3]Nagaoka University of Technology)

グリシン開裂系の T-protein や H-protein 等による 5,10-$CH_2$-THF　(5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸)の生成は、生物に必須な C1 代謝の中心的反応の一つである（Kikuchi *et al.,* 2008）。一方、リグニン由来低分子を唯一の炭素源として生育できるグラム陰性菌 *Sphingobium* sp. SYK-6 株（以下、SYK-6 株）はグリシン開裂系の遺伝子群を持っておらず、LigM と DesA という 2 つ *O*-demethylase によりバニリン酸やシリンガ酸を使って 5-$CH_3$-THF を生成し､MetF 酵素により 5,10-$CH_2$-THF へと変換することで、リグニン由来低分子の代謝を C1 代謝に繋げているという知見が得られた（Masai *et al.,* 2007）。また、LigM は T-protein と 26%の相同性があることから、両者には進化的な関係が示唆されている。LigM と T-protein の進化的関係を明らかにするためには、両酵素の３次元構造に基づく比較や、SYK-6 株の近縁種において両者のオーソログの分布を網羅的に解析する必要があると考え、LigM の結晶構造解析を行うとともに、構造に基づいた進化的な解析を行った。

1.85 Å分解能で決定した LigM の結晶構造を、既に決定されている T-protein(PDB ID: 3A8I)の結晶構造と比較し、それに基づいたアミノ酸配列の比較を行ったところ、両者の立体構造は類似しているものの、LigM は T-protein には存在しない 5 つの挿入配列を持つこと、そのうちの一つが T-protein の H-protein 結合部位に相当する部分を覆っており、LigM は H-protein の結合部位を失っていることが明らかになった。低分子性の基質であるバニリン酸と反応する LigM は H-protein を必要としないため、挿入配列は、両者の機能的差異に関係していると考えられた。また、活性中心の構造比較から、両酵素では触媒残基とその３次元的配置も異なっていることが強く示唆された。これらのことから、LigM と T-protein は、進化的に関係はあるものの、別の酵素として分類すべきであることがはっきりした。更に両者の進化関係に関する知見を得るために、BLAST を用いて *Sphingomonadaceae* family 内における両者の遺伝子の分布を調べたところ、現時点で解析可能な約 230 株の内、79%の菌が T-protein 遺伝子のオーソログのみを持つこと、*ligM* と T-protein 遺伝子両方のオーソログを持つ菌が 20%存在することがわかった。一方、T-protein 遺伝子を持たず *ligM* オーソログのみを有する菌は、SYK-6 株のみであった。以上から、LigM 型酵素は T-protein のパラログとして出現したこと、SYK-6 株はパルプ工場の廃水という特殊な栄養環境で生育してきた為に、T-protein による 5,10-$CH_2$-THF 生成経路を失ったと推定された。

one carbon metabolism, O-demethylase, evolution

講演番号：3J34p11
講演日時：3 月 19 日 16:50～ J 校舎 34 会場

好冷好圧性細菌 Shewanella violacea DSS12 由来のアラニンラセマーゼの性質
Characterization of Alanine Racemase from the Psychro-piezo-philic Bacterium Shewanella violacea DSS12

○板橋 慶亮[1]、寶田 恵里花[1]、德久 真弓[1]、谷川 実[1]、西村 克史[1]、加藤 千明[2]（[1]日大理工、[2]海洋研究開発機構）
○Keisuke ITABASHI[1], Erika TAKARADA[1], Mayumi TOKUHISA[1], Minoru TANIGAWA[1], Katsusi NISHIMURA[1], Chiaki KATO[2] ([1]Nihon Univ, [2]Jamstec)

*Shewanella violacea* DSS12 (*S. violacea*) は, 水深 5,110 m の琉球海溝底泥から単離された最適生育環境 8℃, 300 気圧の好冷好圧性細菌である. アラニンラセマーゼは, L-アラニンと D-アラニンの相互変換を触媒する酵素であり, 細菌細胞壁のペプチドグリカン層に含まれている D-アラニンの合成を担っている. 本研究では, 好圧性微生物が持つ酵素タンパク質の普遍的耐圧性機構を解明することを目的として, タンパク質構造や反応機構が詳細に研究されているアラニンラセマーゼをモデルタンパク質として選択した. ここでは, *S. violacea* のアラニンラセマーゼの酵素学的諸性質を常圧下で調べるとともに高圧下での酵素活性の測定を試みた.

*S. violacea* を Marine Broth 2216 を加えた坂口フラスコを用い, 前培養 (150 rpm, 3 days, 4℃) を行った後, 5 L メディウムビンを用いて好気的に培養（3 days, 4℃）し, 遠心分離 (10,000 rpm, 10 min, 4℃) によって菌体を集めた. 菌体をフレンチプレス (100 MPa) で破砕し, 遠心分離 (4,000 rpm, 10 min, 4℃) 後の上清を無細胞抽出液とした. 無細胞抽出液を超遠心分離 (45,000 rpm, 30 min, 4℃) にかけ, 上清を可溶性画分とした. 可溶性画分を硫安分画 (0-20, 20-40, 40-60, >60% 飽和) し, アラニンラセマーゼ活性の高い 40-60%飽和硫安画分を Butyl-Toyopearl カラム, Phenyl-Sepharose カラム, Sephadex G-75 カラムの順に通し, 部分精製酵素標品を得た.

精製の結果, 比活性は 2.15 μmol/min/mg となり, 精製倍率は 485 倍であった. 部分精製酵素標品を用いて基質特異性を調べたところ, L-Ala, L-Ser に特に高い活性を示した. 最適 pH は 9.0 であり, 最適温度は 45℃であった. 今回精製された *S. violacea* DSS12 由来のアラニンラセマーゼは, 至適 pH, 至適温度ともに既知 (常圧) のアラニンラセマーゼの性質と類似していることが分かった. 現在, 高圧下における酵素学的諸性質の測定を試みている.

Shewanella violacea, Alanine Racemase, D-Amino Acid

講演番号：3J34p12
講演日時：3 月 19 日 17:05～ J 校舎 34 会場

哺乳類 L-セリンデヒドラターゼの酵素学的性質の解析と応用利用
Characterization of mammalian L-serine dehydratase and its application
○武藤 菜摘、伊藤 智和、邊見 久、吉村 徹 (名大院生命農)
○Natsumi MUTO, Tomokazu ITO, Hisashi HEMMI, Tohru YOSHIMURA (Nagoya Univ.)

哺乳類の大部分はセリン/トレオニン代謝酵素として、約 60%の相同性を示す L-セリンデヒドラターゼ（SDS）および L-セリンデヒドラターゼ-like（SDSL）を有している。マウスにおいて、SDS は肝臓特異的に発現することが知られている。一方 SDSL の発現量は、肝臓で最も高いが、精巣、心臓、腎臓においても同程度の発現が認められる。SDS の mRNA は出生の直前に急激に増加するのに対して、SDSL の mRNA は胎児期の初期から発現している。このような SDS と SDSL の発現の時空間的な差異は、これらタンパク質が生体内で異なる役割を担うことを示唆している。本研究では、SDS および SDSL タンパク質の酵素学的な差異を明らかにすることを目的として、組換えタンパク質の解析を行った。

マウスの SDS および SDSL の cDNA 配列を *Escherichia coli* での発現用に最適化した人工遺伝子を合成し、これを pET15b に挿入することで両タンパク質の発現ベクターを構築した。*E. coli* KRX 株を用いて組換えタンパク質を大量発現させ、SDS、SDSL 組換えタンパク質を調製し、両タンパク質がともに PLP 結合タンパク質であることを確認した。種々のアミノ酸に対する反応性を検討したところ、SDS、SDSL はともに L-Ser、L-Thr および L-*allo*-Thr に対してデヒドレーション活性を示した。SDS の $k_{cat}/K_m$ は L-Ser に対して 0.45 $s^{-1}mM^{-1}$ であり、L-Thr に対してはその 2 分の 1 程度であった。また、SDSL は SDS と同様の基質特異性を示したが、その $k_{cat}/K_m$ は各基質に対して SDS の 10 分の 1 程度であった。なお、両タンパク質の Ser および Thr のラセミ化活性や D-Ser、D-Thr および D-*allo*-Thr のデヒドラーゼ活性は認められなかった。

SDS および SDSL が極めて高い L 体アミノ酸への選択性を有することに着目し、これらを用いた D-*allo*-Thr の光学分割法を検討した。L-Thr を、L-Thr に反応性を有する変異体アラニンラセマーゼを用いて L-Thr と D-*allo*-Thr の等量混合物とし、SDS を作用させた。その結果、高い光学純度の D-*allo*-Thr が簡便に得られた。

L-serine dehydratase, characterization, D-allothreonine

講演番号：3J34p13
講演日時：3 月 19 日 17:20～ J 校舎 34 会場

ブナシメジに存在する新奇 D-アミノ酸の同定
Identification of a unique D-amino acid in *Hypsizygus marmoreus*
○伊藤 智和[1]、余 卓尓[1]、吉野 一晴[2]、渡邉 彰[2]、邊見 久[1]、麻田 恭彦[2]、吉村 徹[1]([1]名大院・生命農、[2]香川大・農)
○Tomokazu ITO[1], Zhuoer Yu[1], Issei Yoshino[2], Akira Watanabe[2], Hisashi Hemmi[1], Yasuhiko Asada[2], Tohru Yoshimura[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Kagawa Univ.)

我々は前々大会で、9 種類の担子菌キノコ（エノキタケ、ヒラタケ、マイタケ、ハナビラタケ、ヤコウタケ、ワサビタケ、ブナシメジ、エリンギ、ナメコ）の子実体および栄養菌糸体のアミノ酸分析結果を示し、ブナシメジ子実体に未知の D-アミノ酸が高濃度で存在することを報告した。この D-アミノ酸はタンパク原アミノ酸の異性体ではなく、ユニークな構造を有することが予想されていた。

本 D-アミノ酸の精製過程で、これがセリンやトレオニンと同様の化学的性質を示すことが示唆され、これがピリドキサールリン酸および $Zn^{2+}$依存性の D-セリンデヒドラターゼ(Dsd)の基質となることを見出した。当該 D-アミノ酸を 6-アミノキノリル-*N*-ヒドロキシスクシンイミジルカルバメート（AQC）を用いて誘導体化し、LC-MS 解析に供したところ、この AQC 誘導体の質量電荷比(*m/z*)は 306 であった。また、本 D-アミノ酸の Dsd 消化後に生じるケト酸を、2-ケト-4-ヒドロキシ酪酸と同定した。以上の結果、当該 D-アミノ酸が、D-2-アミノ-3,4-ジヒドロキシ酪酸であることが示された。また、既知の Cα、Cβ位の配向を有する D-2-アミノ-3,4-ジヒドロキシ酪酸を酵素的に合成し、コクロマトグラフィーを行うことで、ブナシメジに存在する D-アミノ酸が、(*2R, 3S*)体の D-2-アミノ-3,4-ジヒドロキシ酪酸であることを確認した。本大会ではこれらの結果に加え、ブナシメジの生長過程における当該アミノ酸の動態解析や、推定代謝機構の検証を行った結果について報告する。

D-amino acid, mushroom

発表責任者：伊藤智和（ito-t@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3J34p14
講演日時：3 月 19 日 17:35～ J 校舎 34 会場

好酸性鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* における D-アミノ酸の影響と D-アミノ酸脱水素酵素の性質

Roles of D-Amino Acids and D-Amino Acid Dehydrogenase in the Acidophilic Iron-Oxidizing Bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*

○鈴木 里菜[1]、朝隈 紗月[1]、上原 汐織[1]、徳久 真弓[1]、谷川 実[1]、西村 克史[1,2]（[1]日本大学、[2]日本大学短期大学部）

○Rina Suzuki[1], Satsuki Asakuma[1], Shiori Uehara[1], Mayumi Tokuhisa[1], Minoru Tanigawa[1], Katsushi Nishimura[1,2] ([1]Nihon Univ., [2]Nihon Univ. Junior College)

【目的】好酸性鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans*（*A. ferrooxidans*）は，最適生育温度が 28℃で最適生育 pH が 2.0 の好気性の独立栄養化学合成細菌であり，$Fe^{2+}$ を $Fe^{3+}$ に酸化して生育する．本菌には遊離の D-Glu, D-Ser, D-Pro, D-Asp などが多く含まれており，また，D-アミノ酸の α 位の水素を引き抜き 2-オキソ酸を生成する D-アミノ酸脱水素酵素（DAD）が存在することがわかっている．本菌の DAD は D-Pro に最も高い活性を示し，その最適温度は 28℃で，最適 pH は 6.5 である．しかし，DAD の *A. ferrooxidans* における生理的役割は未知である．本研究では，*A. ferrooxidans* における D-アミノ酸の存在意義や DAD の役割を明らかにすることを目的として，D-アミノ酸の影響と DAD の性質を調べた．

【方法および結果】*A. ferrooxidans* を，D-または L-アミノ酸を加えた Silverman 9K 培地に植えて，振盪培養した．*A. ferrooxidans* により生成する $Fe^{3+}$ の濃度をロダン塩法により測定し，生育の指標とした．D-Pro を加えた場合，初期に生育遅延が見られたが，その後に生育促進が見られた．また，D-Lys と Gly は生育を促進した．L-Pro, L-Lys, D-Arg, L-Arg を加えた場合には，通常培地と変わらない生育を示した．D-Asp と L-Asp は生育を遅延させ，その他のアミノ酸は生育を阻害した．

D-アミノ酸が DAD 活性に与える影響を調べるため，通常培地に 50 mM D-Pro または D-Ala を加えた培地中で生育した菌体の活性測定を行った．*A. ferrooxidans* 菌体を超音波およびフレンチプレスを用いて破砕した後，遠心分離によって得られた上澄みを無細胞抽出液とした．無胞抽出液を超遠心分離し，膜画分（沈殿）を得た．膜画分を 1% Triton X-100 で可溶化後，超遠心分離によって可溶化膜画分（上澄み）を得た．これをサンプルとして，電子受容体に 2,6-Dichlorophenolindophenol を用いて DAD 活性を測定した．その結果，D-Pro を含む培地中で生育した菌体は，D-Pro を基質としたとき，通常培地の菌体と比べ 1.7 倍高い活性を示した．また，D-Ala を含む培地中で生育した菌体は，基質を D-Ala としたとき，通常培地の菌体と比べ 1.8 倍高い活性を示した．無細胞抽出液に基質（D-Ala）を添加した際の $NAD^+$の還元活性測定の結果，0.87 nmol/min/mg の活性が得られた．

【まとめ】高濃度の D-アミノ酸の多くは生育に有害であったが，D-Pro はある一定の期間が経過した後，生育を促進した．D-Pro や D-Ala は，本菌における DAD の発現を誘導した．DAD による脱水素反応時に生じた電子は，電子伝達系を経て，$NAD^+$の還元に使われると考えられた．

D-Amino acid dehydrogenase, D-Amino acid, *Acidithiobacillus ferrooxidans*

講演番号：3J34p15
講演日時：3 月 19 日 17:50～ J 校舎 34 会場

*Pseudomonas putida* の D-リジン異化代謝オペロンの転写制御機構
Transcriptional regulatory mechanism of D-lysine catabolic operon in *Pseudomonas putida*
○佐藤 大起、近藤 和貴、戸部 隆太、三原 久明（立命館大生命）
○Taiki SATO, Kazutaka KONDO, Ryuta TOBE, Hisaaki MIHARA (Ritsumeikan Univ.)

**【背景・目的】** *Pseudomonas putida* KT2440 は、D-リジンを窒素源・炭素源とする最少培地にて良好に生育する。これは本菌が、D-リジン脱水素酵素（AmaD、PP_3596）をはじめとする D-リジン異化代謝系を有していることに起因する。*amaD* 遺伝子は、他 5 つの遺伝子（*PP_3592*、*PP_3593*、*PP_3594*、*PP_3595*、*PP_3597*）とオペロン（*dlc* オペロン）を構成しており、PP_3593、PP_3594、PP_3595、PP_3596、PP_3597 は ABC トランスポーターの構成タンパク質と相同性を示す。本オペロンの最上流に位置する *PP_3592* 遺伝子の産物は、タンパク質の一次構造から転写制御因子と考えられ、PP_3592 が本オペロンの発現制御を担っていることが推測された。実際に、*PP_3592* 遺伝子欠損株を用いた *dlc* オペロン遺伝子の発現解析により、PP_3592 が *dlc* オペロンのリプレッサーとして機能することが示唆されている。そこで、本研究では、PP_3592 が結合する DNA 領域の解析ならびに、D 体・L 体を含めたアミノ酸依存的な DNA 結合特性を解析することにより、PP_3592 を介する *dlc* オペロンの転写制御の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

**【結果・考察】** *P. putida* KT2440 株のゲノム DNA を鋳型にして、*PP_3592* の高発現プラスミドを作製した。本プラスミドを大腸菌に導入した *PP_3592* 高発現株を作製し、Ni-NTA カラムを用いて His-tag 融合タンパク質として PP_3592 を精製した。また、PP_3592 が結合する DNA 領域を特定するために、本遺伝子上流の塩基配列に着目したところ、本領域には 2 つの逆方向反復配列（IR-1、IR-2）が存在し、この領域に PP_3592 が結合すると考えられた。そこで、IR-1 と IR-2 を含む領域における 6 種の DNA 断片を調製し、精製 PP_3592 を用いたゲルシフトアッセイを行った。その結果、PP_3592 は、IR-1 または IR-2 のいずれか一つを含む DNA 断片に特異的に結合することが示された。また、バンドの蛍光強度の半定量的解析より、PP_3592 の DNA 断片に対する結合定数を求めたところ、IR-1 含有断片と IR-2 含有断片の間に著しい差は認められなかった一方で、これらの断片に比べ、IR-1 と IR-2 の両方を含む DNA 断片へのアフィニティーは著しく上昇した。さらに、PP_3592 のアミノ酸依存的な DNA 結合能を調べるために、種々のアミノ酸存在下でゲルシフトアッセイを行った。その結果、PP_3592 の DNA への結合は、D-リジンおよび D-アルギニン、D-オルニチン存在下で特異的に解除されることを見出した。これらの結果から、PP_3592 が本遺伝子上流部（IR-1、IR-2）に結合することで *dlc* オペロン遺伝子の発現は抑制されており、D-リジン、D-アルギニン、D-オルニチンがインデューサーとして機能することで発現抑制が解除されることが示唆された。

Regulator, D-amino acid, *Pseudomonas putida*

講演番号：3J34p16
講演日時：3 月 19 日 18:05～ J 校舎 34 会場

# グラム陽性菌 *Clostridium sticklandii* 由来 D-セレノシスチンα,β-リアーゼの機能解析

# Characterization of D-selenocystine α,β-lyase from a Gram-positive bacterium, *Clostridium sticklandii*

○中尾 領太、片浦 美沙、戸部 隆太、三原 久明（立命大生命）
○Ryota NAKAO, Misa KATAURA, Ryota TOBE, Hisaaki MIHARA (Ritsumeikan Univ.)

【目的】

D−セレノシスチンα,β−リアーゼは、ピリドキサール5′-リン酸を補酵素として要求するホモダイマー酵素（サブユニット分子量 35,000）であり、D-セレノシスチンをピルビン酸、アンモニア、元素状セレンに分解するα,β−脱離反応を触媒する。本酵素は、D-セレノシスチンの他に、D-システインやD-シスチンなどに対してもα,β−脱離反応を触媒することが知られている。1988 年に*Clostridium sticklandii* ATCC12662 株より本酵素が単離され、その諸性質が報告されたが、それ以来、研究例が無く、遺伝子・アミノ酸配列および構造、生理機能等について不明な点が多い。当研究室では、本酵素遺伝子を同定するために、全ゲノム配列が解読済みの*C. sticklandii* DSM519 株に着目し、候補遺伝子の探索を行った。その結果、大腸菌等で報告されている D-システインデスルフヒドラーゼのホモログとして CLOST_1978 が候補として見出された。本研究では、*CLOST_1978* のクローニングを行い、遺伝子産物の酵素的諸性質を調べることを目的とした。

【結果・考察】

*C. sticklandii* DSM519 株のゲノム DNA を鋳型として、*CLOST_1978* 遺伝子を PCR クローニングし、大腸菌内で His-tag 融合タンパク質として高生産させ、これを Ni-キレートカラムを用いて精製した。精製した本酵素のサブユニット分子質量は SDS-PAGE により 36.1 kDa と求められ、推定アミノ酸配列（329 残基）から計算される値（36.1 kDa）と一致した。本精製酵素は、D-セレノシスチン、D-シスチン、D-システイン、DL-ランチオニンに対して活性を示した。他方、L体に対しては反応を示さなかった。また、本酵素の速度論解析を行ったところ、D-シスチン（$k_{cat}/K_m$ = 2.0 × $10^4$ ($M^{-1}\cdot s^{-1}$)）、D-システイン（$k_{cat}/K_m$ = 2.0 × $10^4$ ($M^{-1}\cdot s^{-1}$)）、DL-ランチオニン（$k_{cat}/K_m$ = 2.0 × $10^4$ ($M^{-1}\cdot s^{-1}$)）、D-セレノシスチン（$k_{cat}/K_m$ = 2.0 × $10^4$ ($M^{-1}\cdot s^{-1}$)）の順で本酵素の良い基質となることが明らかとなった。本酵素の吸収スペクトルを測定したところ、422 nm に吸収極大が認められ、本酵素がピリドキサール5′-リン酸依存的酵素であることが示唆された。本酵素には、ホモログ間で高度に保存されているリジン残基（47番）が存在し、これが補酵素ピリドキサール5′-リン酸とシッフ塩基を形成する残基であると推定された。

selenium, D-amino acid, pyridoxal 5'-phosphate

発表責任者：三原久明（mihara@fc.ritsumei.ac.jp）

講演番号：4A01a02
講演日時：3 月 20 日 09:35～ A 校舎 01 会場

アミノ酸トランスポーターLAT3,4 の発現制御解析
The gene expression analysis of amino acid transporter LAT3,4
○眞鍋 瑞歩[1]、橋詰 力[2]、清水 誠[1]、井上 順[1]、佐藤 隆一郎[1] ([1]東大院農、[2]東大高齢社会総合研究機構)
○Mizuho MANABE[1], Tsutomu HASHIZUME[2], Makoto SHIMIZU[1], Jun INOUE[1], Ryuichiro SATO[1] ([1]The University of Tokyo, [2]IOG)

【背景・目的】人口の高齢化に伴い、運動器の障害により要介護になるリスクが高くなるロコモティブ シンドロームが社会問題となっている。筋肉の増強はアミノ酸を摂取することによって引き起こされる。そのため、アミノ酸の細胞内外の輸送を行なうアミノ酸トランスポーターの発現を制御することで、効率的にアミノ酸を取り込み、筋肉を増強する事が出来ないかと考えた。アミノ酸トランスポーターＬＡＴ３、４は筋肥大効果の高い分岐鎖アミノ酸を基質として輸送するが、その発現制御は明らかにされていない。そこで本研究はアミノ酸トランスポーターＬＡＴ３、４に着目し、その発現制御機構を明らかにする事を目的とした。
【方法】最初に様々な状態のマウスを用いて、どのような条件でアミノ酸トランスポーターＬＡＴ３、４の遺伝子発現変動が起こるのか確認した。マウスの骨格筋からＲＮＡを抽出し、Ｒｅａｌ　ｔｉｍｅ　ＰＣＲ法によってＬＡＴ３、４のｍＲＮＡ量を測定した。次に確認した骨格筋での遺伝子発現変動がどのような因子によって引き起こされるのか明らかにするために、絶食時に筋肉で起こると想定される変化についてマウス由来筋芽細胞Ｃ２Ｃ１２を用いて検証を行なった。さらにアミノ酸トランスポーターＬＡＴ３に関しては、翻訳開始点から上流５ｋｂｐまでのプロモーター領域を含むレポータープラスミドを作製し、Ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ　ａｓｓａｙによって転写活性上昇に重要な配列の特定を行なった。
【結果と考察】絶食時のマウスの骨格筋において、アミノ酸トランスポーターＬＡＴ３、４の発現が顕著に上昇している事を確認した。さらに絶食時に変動するホルモンとして、グルココルチコイドやインスリンが上げられるが、マウス由来筋芽細胞Ｃ２Ｃ１２においてＬＡＴ３、４のｍＲＮＡ量はグルココルチコイドの合成リガンドであるデキサメタゾンの添加によって上昇し、インスリンの添加によって低下した。この結果から、絶食時のマウスの骨格筋でのＬＡＴ３、４の発現変化はこの２つのホルモンによって制御されている可能性が示唆された。
また、デキサメタゾンによる発現上昇は転写活性上昇によるものであった。ＬＡＴ３のレポータープラスミドを用いたＬｕｃｉｆｅｒａｓｅ　ａｓｓａｙの結果、デキサメタゾンによる転写活性上昇にはＬＡＴ３の翻訳開始点から上流３ｋｂｐから５ｋｂｐまでの領域と１ｋｂｐから２ｋｂｐまでのプロモーター領域が重要であることが示された。

amino acid transporter, BCAA, muscle

講演番号：4A01a03
講演日時：3 月 20 日 09:50～ A 校舎 01 会場

線虫のカルシニューリンが関与する寿命制御機構の解析
Analysis of lifespan regulation mediated by calcineurin in *C. elegans*
○近藤 春佳、久米 一規、水沼 正樹（広島大・院先端研・分子生命）
○HARUKA KONDO, KAZUNORI KUME, MASAKI MIZUNUMA (Hiroshima Univ.)

[目的]超高齢化社会を迎えた現在、健康寿命延長の実現のため老化の仕組みの全容解明が急がれている。老化・寿命の研究は世界中で活発に進展しており、酵母や線虫などのモデル生物が用いられている。線虫は体長 1mm ほどの多細胞生物であり、その特徴として以下の点が挙げられる。1. 表皮、神経、筋肉、消化器官、生殖器官を持ち、ヒトとの共通点が多い。2. RNA 干渉により容易に遺伝子破壊の表現系を作り出すことが可能である。3. 寿命が最長 1 カ月程度で、殆どが雌雄同体であるため飼育・繁殖が容易である。これらの点より寿命研究に最も適したモデル生物であることが言える。

これまでに我々は線虫を用いて寿命や酸化ストレス防御に携わる転写因子 SKN-1（ヒト Nrf ホモログ転写因子）の活性制御に関わるキナーゼやホスファターゼの同定を行うため、RNAi 法によりそれらの遺伝子機能をノックダウンさせると SKN-1 の活性を上昇させるものをスクリーニングした。その結果、mTORC2(mammalian target of rapamycin complex 2)の構成因子 Rictor やカルシニューリン(免疫抑制剤 FK506 のターゲット)など興味深い因子が取得され、これらによる SKN-1 を介した新規寿命制御の存在が示唆された。そこで、本研究ではカルシニューリンに着目し、SKN-1 を介した寿命制御のシグナルやそのメカニズム解明を目的とする。

[方法・結果]野生株、*skn-1* 変異株、*daf-16*（FoxO 転写因子）変異株を用いて RNAi 法により線虫カルシニューリンである TAX-6 をノックダウンし、寿命への影響を調べた。その結果、野生株と *daf-16* 変異株の寿命が延長した。一方、*skn-1* 変異株では寿命延長は観察されなかった。したがって、TAX-6 は SKN-1 を介して寿命を負に制御していることが予想された。また、TAX-6 ノックダウンにより野生株の熱ストレス耐性が増加し、酸化ストレス耐性は減少したことから、TAX-6 は熱ストレス耐性を負に、酸化ストレス耐性を正に制御していることが予想された。現在、線虫のカルシニューリンが関わる寿命制御についてさらに解析中である。

*C. elegans*, calcineurin, lifespan

講演番号：4A01a04
講演日時：3 月 20 日 10:05～ A 校舎 01 会場

# 4 系統ヘテロ雌マウスは老齢期まで妊孕性が維持される

# Genetic heterozygosity sustains fertility and egg quality in aged female mice

○小澤 裕介[1]、渡辺 憲史[1]、戸田 年彦[1]、奥村 暢章[1]、河村 和弘[2]、清水 孝彦[1]([1]千葉大学 先進加齢医学、[2]聖マリアンナ医科大学 産婦人科)
○Yusuke OZAWA[1], Kenji WATANABE[1], Toshihiko TODA[1], Nobuaki OKUMURA[1], Kazuhiro KAWAMURA[2], Takahiko SHIMIZU[1] ([1]Department of Advanced Aging Medicine, Chiba University Graduate School of Medicine, [2]Department of Obstetrics and Gynecology St. Marianna University School of Medicine)

少子高齢化社会を向かえ不妊症の増加は大きな社会問題となっている。その中で加齢に伴う女性の残存卵胞数の減少と卵子の質低下による妊孕性低下が生殖医療の大きな障壁で課題になっている。加齢に伴う妊孕性低下を規定する因子の同定にはモデルマウスの開発が望まれている。本研究は、遺伝的背景を不均一化した4系統ヘテロマウスの妊孕性に関する加齢変化を調べる事を目的とした。4系統ヘテロマウスは、C57BL/6NCrslc雄マウスとBALB/cCrslc雌マウスの交配で2系統ヘテロマウスを作出し、別にDBA/2Crslc雄マウスとC3H/Heslc雌マウスを交配し2系統ヘテロマウスを作出した。前者の雌マウスと後者の雄マウスを交配し、4系統ヘテロマウスを作出した。

次に若齢4系統ヘテロ雌マウス(3～6ヶ月齢)を同系統またはICR系統の雄マウスと1ヶ月間自然交配したところ、平均産仔数が5.5 ± 3.5匹(n = 15)でC57BL/6マウスと同程度の産仔数を示した。一方、老齢C57BL/6マウス(10～15ヶ月齢)は産仔数が極端に減少するが、老齢4系統ヘテロマウスは13ヶ月齢でも若齢と同程度の4.4 ± 2.0匹(n = 21)の平均産仔数を示した。更に19ヶ月齢まで自然交配を継続したところ、21匹中7匹のマウスが1ヶ月間の自然分娩で32 匹の産仔を得た。次に、老齢マウスの卵巣全体で連続切片を作製し、原始卵胞数を計測した。老齢4系統ヘテロマウスは卵巣全体で78 ± 22個、老齢C57BL/6マウスは 5 ± 7 個とヘテロマウスで原始卵胞数が有意に多かった。卵巣における遺伝子発現解析の結果、4 系統ヘテロマウス卵巣では卵胞マーカー遺伝子*R-spondin2*と寿命制御遺伝子*Sirt2*, *Sirt4*, および *Sirt7*の発現が有意に高かった。最後に、過排卵刺激による採卵と体外受精を行ったところ、13ヶ月齢の4系統ヘテロ雌マウスの排卵数は平均3.9個/匹(n = 21)で、若齢4系統ヘテロ雌マウスに比べ有意に減少していた。しかし、形態学的正常卵子率は86% (72/83個)、受精率は65% (54/83個)、着床率48% (26個/胚移植54個)、出生率は35% (19匹/胚移植54 個)であり、コンベンショナルな若齢マウスと同率であった。

以上の結果から、4系統ヘテロ雌マウスは加齢による原始卵胞数減少と卵子の質低下が緩徐であり妊孕性が延伸している事が判明した。本モデルマウスは加齢と妊孕性低下に関する研究に非常に有用なモデルマウスと考えられる。

Ovary, Sirt

講演番号：4A01a05
講演日時：3 月 20 日 10:20～ A 校舎 01 会場

# 海棲ほ乳類（ラッコ）の味覚受容体遺伝子の分子生物学的解析

# Molecular analysis of taste receptor genes derived from sea otter

○海老原 充[1]、若井 嘉人[2]、中野 千里[2]、大島 結[1]([1]石川県大食品、[2]鳥羽水族館)
○Mitsuru Ebihara[1], Yoshihito Wakai[2], Chisato Nakano[2], Yui Oshima[1] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]Toba Aquarium)

【背景と目的】

約 5,000 万年前から海に回帰し適応した海棲ほ乳類は、陸棲ほ乳類が持つ甘味、苦味、うま味、酸味、塩味の基本五味を失ったことが明らかになりつつある。これまで、クジラ・イルカなどの鯨偶蹄目、アシカ、アザラシなどの鰭脚目、マナティーなどの海牛目のいずれも基本五味に対する応答を失っていることから、海棲に適応するための収斂進化が推定されている。これらの海棲ほ乳類は、餌を咀嚼せず海水とともに丸呑みする共通の食行動が観察される。一方、食肉目に属するラッコ（***Enhydra lutris***）は、主食である貝やウニなどを海面まで運び、咀嚼して食べている点で大きく異なる。咀嚼は陸棲ほ乳類の特徴であるとともに、味物質の受容に重要な食行動である。さらに、ラッコが海棲となったのは約 500 万年前と推定されており、他の海棲ほ乳類と比較して遅れており、ボディーデザインなども遠洋まで泳ぐには適していないことから、味覚受容も他の海棲ほ乳類とは異なることが示唆されている。以上のことから、ラッコの味覚受容体遺伝子を単離同定し、その機能を解析することを本研究の目的とした。

【方法】

ラッコサンプルは鳥羽水族館より死亡個体の筋肉組織の提供を受け、常法により高分子量 DNA を抽出した。味覚受容体遺伝子のクローニングには degenerated PCR 法を用いた。Degenerated primer は、イヌ、パンダ、フェレットの各味覚受容体遺伝子を用い、その保存された領域に PrimerSelect(DNASTAR 社）を用いて作製した。

【結果と考察】

うま味受容体遺伝子（T1R1 および T1R3)、甘味受容体遺伝子（受容体 T1R2 および T1R3)、酸味受容体遺伝子（PKD1L3 および PKD2L1)、塩味受容体遺伝子（ENaC）の各遺伝子をクローニングするとともに、苦味受容体遺伝子として T2R1、T2R3、T2R4、T2R5、T2R9、T1R10、T2R16、T2R38、T2R39、T2R40、T2R41、T2R42、T2R60 の 13 遺伝子を単離同定することができた。これらのうち、酸味受容体遺伝子（PKD1L3）と苦味受容体 6 遺伝子の偽遺伝子化が確認されたが、他の味覚受容体遺伝子は機能的であることが示唆された。

以上の結果から、ラッコはこれまで解析された中で、機能的な味覚受容体遺伝子を持つ唯一の海棲ほ乳類であることが明らかとなった。

taste receptor, sea otter, marine mammals

発表責任者：海老原　充（ebihara@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：4A01a06
講演日時：3 月 20 日 10:35～ A 校舎 01 会場

# ショウジョウバエ新規オクトパミン受容体 DmOA3 の機能解析

# Functional analysis of the novel octopamine receptor DmOA3 from *Drosophila*

○前原 志穂里[1]、中川 寛之[2]、冨田 淳[2]、粂 和彦[2]、太田 広人[1] ([1]熊大院・先端科学、[2]名市大院・薬学)
○Shiori MAEHARA[1], Hiroyuki NAKAGAWA[2], Jun TOMITA[2], Kazuhiko KUME[2], Hiroto OHTA[1] ([1]Kumamoto Univ., [2]Nagoya City Univ.)

【目的】昆虫の神経系には、生体アミンの一種オクトパミン（OA）とその受容体が存在し、様々な生理機能を調節している。OA 受容体の機能と昆虫体内での役割を理解することは、生理学的に重要であるだけでなく、害虫防除への応用も期待される。本研究では、ニカメイチュウから最近発見された新規 OA 受容体 CsOA3（Wu *et al*., 2014）のオルソログ遺伝子をショウジョウバエからクローニングし、受容体の薬理学的な機能解析に加え、同昆虫の行動に対する影響を調べた。
【方法】ショウジョウバエから当該 OA 受容体遺伝子 *CG18208*（以下、*DmOA3*）を PCR クローニングし、発現ベクターpcDNA3 に組み込んだ。このベクターを HEK-293 細胞または CHO-K1 細胞に導入し、受容体安定発現細胞を作製した。その細胞に対するリガンド応答性をエクオリン $Ca^{2+}$アッセイで評価した。行動解析は、*DmOA3* mRNA の発現量が著しく減少するトランスポゾン挿入突然変異体の歩行活動を、赤外線を使った行動測定装置（*Drosophila* Activity Monitoring システム）を用いて測定した。
【結果】エクオリンアッセイの結果、DmOA3 は OA に対して濃度依存的に応答することを確認した。各生体アミンのアゴニスト活性を比較すると、OA=シネフリン>チラミン>ノルアドレナリン>ドーパミンの順になった。シネフリンの高いアゴニスト活性は、他の昆虫 OA 受容体にも見られる特徴である。既知の OA アンタゴニストを評価した結果、本受容体に強く作用することも分かった。以上の結果から、DmOA3 は、OA 受容体としての薬理学的特性を有する受容体であることが分かった。OA シグナルはショウジョウバエにおいて、活動量や摂食の制御に関与することが知られている。行動解析の結果、コントロール系統と比べて *DmOA3* 変異体では活動量の有意な減少が見られた。ショウジョウバエでは絶食時に活動量の顕著な増加が見られるが、OA レベルが低下する突然変異体では、その応答が抑制されることが報告されている。*DmOA3* 変異体においても同様に、絶食時の活動量の増加が見られなかった。以上の結果から、DmOA3 を介した OA シグナルが活動量や摂食行動の制御に関与することが考えられ、現在、その詳細について解析中である。

octopamine receptor, GPCR, *Drosophila melanogaster*

発表責任者：太田広人（hiohta@gpo.kumamoto-u.ac.jp）

講演番号：4A01a07
講演日時：3 月 20 日 11:00～ A 校舎 01 会場

# *Ce*-AKH-GnRH 合成ペプチドが線虫 *Caenorhabditis elegans* の産卵過程促進に寄与するか否かの検討

# Investigation whether *Ce*-AKH-GnRH synthetic peptide promotes egg-laying process in *Caenorhabditis elegans*

○齋藤 雪子、塚越 紀子、片山 秀和、笹川 昇（東海大）
○Yukiko SAITO, Noriko TSUKAGOSHI, Hidekazu KATAYAMA, Noboru SASAGAWA (Tokai Univ.)

脊椎動物では、視床下部ゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)が下垂体前葉からのゴナドトロピン放出を刺激している。このホルモンの受容体は GnRHR と呼ばれ、線虫 *C. elegans* においても、この受容体に対するオルソログの存在(*Ce*-GnRHR)が知られている。また、ショウジョウバエやカイコにおいて、GnRH 受容体に対するリガンドは脂質動員ホルモン(AKH)であることが示されている。

海外の研究者により、*Ce*-GnRHR のリガンドとなるペプチド配列が *in silico* によって探索された。それによると、このペプチドとその前駆体は昆虫の脂質動員ホルモン(AKH)と被嚢類・高等脊椎動物の GnRH プレプロホルモンの両方に類似している。このペプチドは *Ce*-AKH-GnRH と名付けられ、*Ce*-AKH-GnRH は *Ce*-GnRHR と結合活性を有し、この受容体のリガンドであることを示唆する結果が報告されている。

さらにこの研究グループによると、線虫 *C. elegans* で *Ce*-AKH-GnRH もしくは *Ce*-GnRH 受容体をノックダウンすると産卵過程の遅延が起こり、産卵数も 15－35%程度減少することが判明した。これらの結果は AKH-GnRH シグナルが線虫 *C. elegans* の産卵を制御していることを示唆しており、これは哺乳類における GnRH ペプチドの欠乏や、GnRH 前駆体・受容体遺伝子の変異によって起こる思春期遅延に匹敵するものであるといえる。

この研究グループの報告が正しければ、*Ce*-AKH-GnRH の過剰発現もしくは過剰投与は線虫 *C. elegans* における産卵数を増加させるのではないかという仮説が成り立つ。この仮説を検証するため、まず我々は *Ce*-AKH-GnRH のペプチド配列 pQMTFTDQWT を、常法による Fmoc ペプチド固相合成法によって合成した。さらにこのペプチドの存在下で線虫 *C. elegans* を維持することにより、このペプチドによる線虫 *C. elegans* の表現型変化を追究することを目指した。このペプチド溶液の溶媒には DMSO を用いた。培地に添加もしくは溶液に添加する際、まず終濃度が 10μM となるようにした。現在、この濃度や線虫 *C. elegans* に対する曝露時期の検討を行っている最中である。

*C.elegans* , egg-laying, gonadotropin-releasing hormone receptor

講演番号：4A01a08
講演日時：3 月 20 日 11:15～ A 校舎 01 会場

リゾチームプロモーターを用いた卵白特異的ヒトエリスロポエチン生産
Egg white-specific production of erythropoietin by chicken lysozyme promoter
○森脇 脩一郎、小島 佑介、奥嵜 雄也、淺井 聖也、土田 将大、金岡 英徳、西島 謙一、飯島 信司(名大院工)
○Shuichiro MORIWAKI, Yusuke KOJIMA, Yuya OKUZAKI, Seiya ASAI, Masahiro TSUCHIDA, Hidenori KANEOKA, Ken-ichi NISHIJIMA, Shinji IIJIMA (Nagoya Univ.)

【目的】
近年のバイオ医薬品市場の拡大に伴い、抗体などの有用タンパク質を安価に大量生産させる技術が必要とされている。我々はニワトリが卵にタンパク質を大量に生産できる点に着目し、遺伝子組換え技術を用い卵白中に有用タンパク質を生産させるための技術開発を進めてきた。これまでに、全身発現プロモーターを用いて、モデル抗体や TNFR/Fc を鶏卵中に生産させることに成功してきた。しかし、生産させるタンパク質によってはニワトリ個体に悪影響が出てしまう可能性がある。そこで本研究では、卵白の主要タンパク質のひとつであるリゾチームのプロモーター(Plyso)に着目し、卵白特異的に有用タンパク質を高生産させる技術の開発を目指した。
【方法と結果】
Plyso 上流 10 kb の範囲内には-6.1、-3.9、-2.7、-1.9、-0.7 kb の 6 カ所に異なる機能を持つ DNase I Hypersensitive Site (DHS)が存在すると報告されている。そこで、転写開始点から上流 2.8 kb までの配列を取得し、上流から-2.7 kb、-2.4 kb、-1.9 kb と DHS を 1 つずつ削った 4 種のトランケーションプロモーター(Plyso2.7, Plyso2.4, Plyso1.9, Plyso1.4)を作製した。これらのプロモーターを用いたヒトエリスロポエチン(hEPO)発現レトロウイルスベクター (pMSCV/GFP/Plyso-hEPO-WPRE)にて、遺伝子導入ニワトリ($G_0$)を作製し、個体での hEPO 発現解析を行った。
卵白及び血清の hEPO 濃度を EpoR-Ba/F3 細胞を用いた Bioassay にて定量を行った。卵白において、ホルモン応答配列を持つ-1.9 kb DHS を含むコンストラクトの生産性はいずれも高く、最大で 24,000 IU/mL であり、さらに産卵開始後半年から 1 年に渡り安定して生産されることを確認した。これらの個体の血清 hEPO 濃度は卵白の 1／100 以下と低く、hEPO が卵白特異的に発現しているものと考えられた。次に、-1.9 kb DHS の重要性を明らかにするため、Plyso2.7 から-1.9 kb DHS のみを削ったコンストラクト(Δ1.9)のニワトリを作製した。その結果、生産性は低下し、より短い Plyso1.4 と同程度の生産性となった。さらに、卵白への生産性を評価するため、卵白を分泌する Tublar Gland Cell(TGC)を輸卵管から精製し hEPO の mRNA 及び導入遺伝子のコピー数の解析を測定し、mRNA 発現量と卵白中 hEPO 濃度を TGC における導入遺伝子のコピー数で補正した。その結果、-1.9 kb DHS を含むコンストラクトにおいて高い生産性を示し、-1.9 kb DHS が卵白特異的高発現に寄与していることが明らかとなった。

Transgenic chicken, Protein production, Lysozyme promoter

発表責任者：森脇脩一郎（syuichiro110@icloud.com）

講演番号：4A01a09
講演日時：3 月 20 日 11:30～ A 校舎 01 会場

サブトラクション PCR 法を用いたホタルイカルシフェラーゼ候補 cDNA のクローニング
Cloning of potential cDNAs encoding luciferase of the firefly squid by PCR-based subtractive cDNA cloning
○石田 裕幸[1,2]、浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大工・生工研セ、[2]JST, ERATO)
○Yuko ISHIDA[1,2], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., Biotech. Res. Center & Dept. Biotech., [2]JST, ERATO)

【目的】ホタルイカ(*Watasenia scintillans*)の身投げは富山湾における春の風物詩である。その特有の青色の発光現象は、ホタルイカルシフェラーゼの触媒反応によってもたらされ、その際に、基質の coelenterazine disulfate から coelenteramide disulfate へ変換される。しかし、その酵素の安定性は極めて低く直接精製が困難だったため、ホタルイカ命名から 100 年、発光現象がルシフェラーゼ関与と結論されてから 30 年もの間、発光分子機構は明らかにされなかった(Watase, 1905; Tsuji, 1985, Teranishi and Shimomura, 2006)。本研究ではサブトラクション PCR を用いて発光器特異的に発現するホタルイカルシフェラーゼの候補遺伝子の同定を試みた。
【方法】ホタルイカは魚津水族博物館より譲渡あるいは魚津漁協より購入した。第 4 腕の先端の発光器と対照区の第 1-3 腕の先端をカミソリで切断し、試料とした。全 RNA は TRIzol 試薬(Thermo Fisher Scientific)を用いて精製し、サブトラクション PCR は PCR-Select cDNA Subtraction Kit (Clontech)を用いて行った。cDNA は SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech)あるいは GeneRacer Kit (Thermo Fisher Scientific)を用いて合成し、RACE 法で全長 cDNA の塩基配列を決定した。同定遺伝子の転写産物の蓄積は RT-PCR 法で検出した。
【結果】サブトラクション PCR より得られた 108 個の cDNA 断片は、24 種類の遺伝子と相同性があった。その中には acyl CoA synthetase と相同性を持つ cDNA 断片が多かったため、それを用いて RACE 法で全長の塩基配列を決定した。塩基配列から 4 種類の cDNA が同定できた。それぞれ *W. scintillans* acyl CoA synthetase 1, 2, 3 (WsciACS1, WsciACS2, WsciACS3-K84, WsciACS3-Q84)と名付けた。WsciACS1 はアミノ酸レベルで *Acinetobacter baumannii* acyl CoA synthetase と 26%の相同性、WsciACS2、WsciACS3-K84、WsciACS3-Q84 はナガガキ(*Crassostrea gigas*) acyl CoA synthetase と 27%の相同性があった。ホタル(*Photinus pyralis*)ルシフェラーゼは、基質(ルシフェリン)の構造は異なるが、ATP-dependent monooxygenase/long chain fatty acyl-CoA synthetase であることから(Oba et al., 2003)、新たに同定された cDNA はホタルイカルシフェラーゼをコードしている可能性が示された。

Oba et al. (2003) FEBS Lett., 540, 251-254.
Teranishi and Shimomura (2008) Biochim., Biophys. Acta, 1780, 784-792.
Tsuji (1985) PNAS, 82, 4629-4632.
Watase (1905) Zool. Sci., 17, 119-123.

firefly squid, potential luciferase cDNAs, PCR-based subtractive cDNA cloning

発表責任者：浅野泰久（asano@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：4A01a10
講演日時：3 月 20 日 11:45～ A 校舎 01 会場

# ゲノム編集法を用いた choline 産生酵素 GDE5 の欠損細胞、および欠損マウスの作製とその形質の解析

# Generation and phenotypic analysis of *Gde5* deficient NIH-3T3 cells and mice using genome editing.

○中村 美奈子[1]、佐久間 哲史[2]、星野 由美[1]、中山 航[3]、中川 佳子[4]、竹尾 透[4]、中潟 直己[4]、加藤 範久[1]、島田 昌之[1]、山本 卓[2]、矢中 規之[1] ([1]広島大院・生物圏、[2]広島大院・理、[3]広島大・生物生産、[4]熊本大・CARD)
○Minako NAKAMURA[1], Tetsushi SAKUMA[2], Yumi HOSHINO[1], Kou NAKAYAMA[3], Yoshiko NAKAGAWA[4], Toru TAKEO[4], Naomi NAKAGATA[4], Norihisa KATO[1], Masayuki SHIMADA[1], Takashi YAMAMOTO[2], Noriyuki YANAKA[1] ([1]The Graduate School of Biosphere Sci., Hiroshima Univ., [2]The Graduate School of Science., Hiroshima Univ., [3]Faculty of Applied Biological Sci., Hiroshima Univ., [4]CARD., Kumamoto Univ.)

【背景・目的】choline は phosphatidylcholine や acetylcholine の合成材料として細胞機能に必須である。その不足は肝障害をはじめとした様々な疾病発症との関連性が指摘されており、生体内 choline の恒常性の維持は極めて重要である。当研究室が同定した glycerophosphodiesterase 5 (GDE5)は glycerophosphocholine (GPC)を基質として分解し、choline を遊離する細胞内の choline 生成の鍵酵素であると考えられており、種々の培養細胞において siRNA 法による Gde5 ノックダウンにより細胞内 GPC の著しい蓄積を生じることから、細胞内の恒常的な choline 供給に果たす本酵素の重要な役割が示唆されている。そこで本研究では、ゲノム編集法を用いて *Gde5* 遺伝子欠損細胞および欠損マウスを作出し、その形質を解析することで、本酵素の生理機能の解明を目標とした。
【方法・結果】GDE5 は細胞内の choline 供給において必須酵素であると予測し、両対立遺伝子での完全欠損は細胞の生存に致死的に影響し、編集細胞の樹立が困難となると考え、片アレルのみの欠損を目指したゲノム編集を行った。*Gde5* 遺伝子座の酵素活性中心をコードする exon 8 近傍の intron 領域を切断する人工ヌクレアーゼ TALEN vector、および標的 exon の前後のゲノム領域で puromycin 耐性遺伝子を挟み込んだ targeting vector を構築した。マウス線維芽細胞株 NIH-3T3 細胞にリポフェクション法により導入後、puromycin 耐性による選抜と限界希釈法により組換え NIH-3T3 細胞を単離した。genome PCR 法によって片アレルでの相同組換えが確認された 2 株を *Gde5* 片アレル欠損細胞(GDE5 編集細胞)として利用し、real-time PCR 法により *Gde5* mRNA の発現量の低下を確認した。さらに、MTT assay と細胞数計測によって野生型 NIH-3T3 細胞と比較して GDE5 編集細胞で増殖性の低下が認められ、また EGF receptor 遺伝子の発現量が有意に上昇していたことから、GDE5 による細胞内の choline 供給が細胞増殖に関与することが示唆された。一方、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集法により、*Gde5* 遺伝子座の酵素活性中心をコードする exon 11 を欠失させた *Gde5* ヘテロ欠損マウスを作製した。雌雄のヘテロ欠損マウス(F2)を用いて交配を行った結果、*Gde5* ホモ欠損マウスは胎生 10.5 日において確認されず、胎生致死であった。また、ヘテロ欠損マウスの精子、ならびに卵子を用いた体外受精、および体外培養によって調製した胚盤胞の genotyping を行った結果、*Gde5* ホモ欠損の胚盤胞が確認された。これらの結果より、着床後早期における *Gde5* ホモ欠損マウスの異常が示唆されたことから、今後はこの発生段階における *Gde5* ホモ欠損マウスの形質を解析するとともに、choline 欠乏食を負荷した *Gde5* ヘテロ欠損マウスの形質の解析を行う予定である。

GDE5, choline, genome editing

発表責任者：中村美奈子（m160136@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：4A02a01
講演日時：3 月 20 日 09:20～ A 校舎 02 会場

# 創傷治癒における脂肪組織由来間質細胞と炎症細胞との相互作用

# Interaction between adipose tissues-derived stromal cells and inflammatory cells in wound healing

○服部 秀美[1]、石原 雅之[2] ([1]宮崎大農、[2]防衛医大研究センター)
○Hidemi HATTORI[1], Masayuki ISHIHARA[2] ([1]Miyazaki Univ., [2]National Defense Medical College)

【目的】炎症とは様々な侵襲に対する生体反応であり、特に生体に外傷などの侵襲が加わると多種多様な分子や細胞が活性化され、血管新生や肉芽形成そして線維化が亢進し、組織は修復・再生される。脂肪組織由来間質細胞（ASCs）は、細胞移植療法において有用な細胞供給源になりえるといわれているものの、その詳細な作用機序については不明な点が多い。今回、創傷治癒のスタートである炎症に着目し、ASCs と炎症細胞との相互作用をサイトカイン、ケモカイン、Matrix metalloproteinase (MMP)等の分泌能の変化から検討し、創傷治癒に与える影響を調べた。
【方法】GFP 陽性マウスの大腿骨から骨髄細胞を採取した。X 線照射（6 Gy）したマウスに GFP 陽性骨髄細胞を尾静脈から注入し、そのマウスの耳にパンチで損傷を作り、治癒過程を *in vivo* imaging 装置で観察した。C57BL/6 マウスの鼠蹊部の皮下脂肪組織から細胞を採取し、2 継代した細胞を ASCs として使用した。ASCs を PKH26 で蛍光ラベルした後、GFP 陽性骨髄細胞を移植したマウスの皮下に移植し、GFP 陽性細胞の挙動を *in vivo* imaging 装置で観察した。炎症細胞を同定するために組織標本を作製し、Gr-1、F4/80、CD11c に対する蛍光免疫染色を行った。また、磁気細胞分離装置により採取した Gr-1、F4/80、CD11c 陽性細胞を ASCs と共培養をし、培養上清中の分泌性タンパク質を Bio-Plex 及び ELISA で定量した。
【結果・考察】血管内を循環している GFP 陽性骨髄細胞が損傷部位及び ASCs 移植部位へ遊走する様子が観察された。損傷部位に遊走された GFP 陽性細胞は Gr-1、F4/80 陽性の炎症細胞であり、ASCs 移植部位に遊走された GFP 陽性細胞は Gr-1、F4/80、CD11c 陽性の炎症・抗炎症細胞であった。ASCs は、元々サイトカイン・ケモカイン分泌能が高い細胞であるが、Gr-1、F4/80 及び CD11c 陽性細胞と共培養すると、MIP-1 α、MIP-1 β、MIP-2、KC、MCP-1、IL-6 の分泌が著しく上昇した。MMPs に関しては、F4/80 あるいは CD11c 陽性細胞と共培養すると分泌能が高くなった。一方、抗炎症作用を有する G-CSF、MIG も、Gr-1、F4/80 及び CD11c 陽性細胞と共培養すると分泌能が高くなった。しかし、MMP 阻害因子の TIMP-1、-2 は、Gr-1、F4/80 及び CD11c 陽性細胞と共培養してもそれらの分泌能には変化がなかった。
ASCs は炎症性サイトカインやケモカインを高濃度に分泌することによって、移植部位に過剰な骨髄由来炎症細胞を集積させ、炎症を惹起させることが分かった。また、ASCs 移植後 7 日目には、抗炎症性マクロファージ（CD11c 陽性細胞）が遊走されていたことから、過剰な炎症を誘発させるだけでなく、炎症を収束させる抗炎症性作用も有していることが明らかとなった。ASCs は炎症細胞と相互作用しながら、損傷の程度に応じて適切な治癒機能を発揮させているのではないかと示唆された。

adipose tissues-derived stromal cells, inflammatory cells, wound healing

講演番号：4A02a02
講演日時：3 月 20 日 09:35～ A 校舎 02 会場

ミズクラゲのストロビレーションに伴って発現増加するリソソーム加水分解酵素遺伝子群の解析
Molecular analyses of lysosomal hydrolase genes upregulated during strobilation in the moon jellyfish, *Aurelia aurita*.

○辻田 菜摘[1]、小山 寛喜[1]、辻 敏之[2]、矢中 規之[1]、荒川 賢治[3]、国吉 久人[1]([1]広島大院・生物圏、[2]長浜バイオ大・バイオサイエンス、[3]広島大院・先端研)
○ Natsumi TSUJITA[1], Hiroki KOYAMA[1], Toshiyuki TSUJI[2], Noriyuki YANAKA[1], Kenji ARAKAWA[3], Hisato KUNIYOSHI[1] ([1]Grad. Sch. Biosphere Sci. Hiroshima Univ, [2]Dept. Biosci., Nagahama Inst. Bio-Sci. Tech., [3]AdSM Hiroshima Univ.)

【背景】ミズクラゲ(*Aurelia aurita* s. l.)は、無性生殖をおこなうポリプ世代と有性生殖をおこなうクラゲ世代を繰り返す生活環をもつ。ポリプ世代からクラゲ世代への転換期には、海水温の低下にともなって、ポリプの胴部に口丘側から足盤側へ向けて数個～十数個の分節を生じる(分節形成期ストロビラ)。その後それぞれの分節はクラゲの形態へと変化し(形態形成期ストロビラ)、エフィラとなって海水中に泳ぎ出る。この分節の形成からはじまる一連の過程はストロビレーションと呼ばれ、成体クラゲの個体数を決定する上で非常に重要なステップとなっている。演者らのグループでは、ストロビレーションの分子機構の解明を目指し、ポリプよりもストロビラで発現量の多い遺伝子群の同定を進めてきた。前大会では、トランスクリプトーム解析により、リソソーム加水分解酵素遺伝子のうち、*aspartylglucosaminidase*(*AGA*)遺伝子と *arylslufatase B*(*ARSB*)遺伝子がストロビラで発現上昇していることを見出したこと、リソソームの酸性化阻害剤(chloroquine, bafilomycin A1)の投与によりストロビラからクラゲへの形態形成が部分的に阻害されることを報告した。*AGA* および *ARSB* はともにヒトにおけるリソソーム蓄積病の原因遺伝子として知られており、AGA は N 結合型糖鎖付加型 Asn の加水分解を触媒し、ARSB はデルマタン硫酸およびコンドロイチン硫酸の脱硫酸化を担う。本大会では、これらのリソソーム酵素遺伝子のより仔細な解析結果を報告する。
【方法・結果】*AGA* と *ARSB* の全長 cDNA のクローニングをおこない、これらの配列を明らかにした。その結果、ミズクラゲ AGA および ARSB のアミノ酸配列は、ともにシグナルペプチドと N-結合型糖鎖付加部位のコンセンサスに合致する Asn 残基を複数有していた。AGA と ARSB はどちらにおいても、機能上および構造上重要なアミノ酸が保存されており、ミズクラゲにおける機能的なオーソログであることが示唆された。また、*AGA* および *ARSB* のストロビレーション中の発現変動を、real-time RT-PCR 法により解析した。その結果、*AGA* は分節形成期および形態形成期ストロビラで同程度に高く発現しており(ポリプの約 10 倍)、エフィラにおいては発現量が減少した(ポリプの約 5 倍)。*ARSB* は形態形成期ストロビラでもっとも発現量が高く、ポリプの約 74 倍発現していた。現在は、*AGA* および *ARSB* の発現の局在性を調べている。

lysosome, moonjelly, metamorphosis

講演番号：4A02a03
講演日時：3 月 20 日 09:50～ A 校舎 02 会場

# 大腸癌細胞にアノイキスを誘導する酸化コレステロールのメカニズム解析

# Mechanism analysis of oxysterols induced anoikis in colon cancer cells

守冨 早織[1]、齋藤 瞭子[1]、上原 至雅[2]、○田中 亜路[1] ([1]安田女子家政、[2]岩手医薬)
Saori Moritomi[1], Ryoko Saito[1], Yoshimasa Uehara[2], ○Arowu Tanaka[1] ([1]Yasuda Women's Univ., [2]Iwate Medical Univ.)

血球系以外の通常細胞の多くは、生存・増殖のために「足場」を必要とし、足場が失われた場合にはアポトーシスをおこす。このアポトーシスは特別にアノイキスと呼称されている。一方、ほとんどの癌細胞ではアノイキスは強く抑制されている。この「癌細胞の足場非依存的増殖」のメカニズムは現時点でも不明な点が多いが、その性質上、細胞接着や細胞骨格に着目した研究が行われている。癌の転移は、さまざまなプロセスをクリアした結果に生じてしまう多段階的な現象であるが、この「癌細胞の足場非依存的増殖」は、その最も根本的な条件であるといえる。

発表者は、大腸癌細胞株 DLD-1 の強制浮遊培養系を用いて、酸化コレステロールの一種である 25-hydroxycholesterol(25-HC)がアノイキスを誘導すること、しかし、接着状態の DLD-1 細胞にはアポトーシスを誘導しないことを見出した。興味深いことに、25-HC とよく似た酸化コレステロールとしてその差異もほとんど注目されていない 22-(R)-hydroxycholesterol(22-HC)は、アノイキス誘導活性を有しないことを示している(当然ながら、コレステロールにもこの活性はない)。

本発表では、25-HC が大腸癌細胞にアノイキスを誘導するメカニズムについての解析結果を発表する。これまでに ROCK1 がアノイキス誘導におおきな役割を果たしていたことを明らかにしていたが、その直接の上流である Rho そのものが活性化されていることを見出した。この結果は、25-HC が細胞膜-細胞骨格系の情報伝達システムに直接影響を与えうることを示唆するもので、最近報告が相次いでいる 25-HC の免疫応答系への役割を理解するための新たな議論の土台となると考えられる。

oxysterol, anoikis

講演番号：4A02a04
講演日時：3 月 20 日 10:05～ A 校舎 02 会場

カイコガ雄性生殖器原基の発達におけるホルモン調節機構
Hormonal Regulation for the Development of the Male Genital Disc in *Bombyx mori*.
○藤永 大輝[1]、片岡 宏誌[1]、溝口 明[2] ([1]東大院・新領域・先端生命科学、[2]愛知学院大・教養)
○Daiki FUJINAGA[1], Hiroshi Kataoka[1], Akira Mizoguchi[2] ([1]Grad. Sch. of Fro. Sci., the Univ. of Tokyo, [2]Lib. Arts Sci., Aichi Gakuin Univ.)

【背景】
昆虫の成長はホルモンによって制御されている。なかでも脱皮ホルモンであるエクジステロイドは脱皮や変態など様々な発生のイベントを制御している。完全変態昆虫では幼虫期に未発達な状態で保持されていた成虫原基が変態期に急速に発達して成虫器官へと分化するが、この発達を誘導するのは活性型の脱皮ホルモンである 20-ヒドロキシエクジソン (20E)である。一方で、インスリン様成長因子 (IGFLP)もまた成虫原基の成長発達を促進する。しかしながら、両ホルモンがどのような機構で成虫原基の成長発達を促進するかは明らかになっていない。
そこで、本研究では 20E とカイコガ IGF 様ペプチド (BIGFLP)の血中濃度を測定し、両ホルモンの成長作用を生殖器原基の培養系を用いて解析した。

【結果】
測定した 20E と BIGFLP の血中濃度をもとにして、生殖器原基の培養系を確立した。両ホルモン添加後の原基の長軸の長さを計測すると、20E による伸長がみられた。また、両ホルモンによるタンパク質量の増加が観察された。両ホルモンを同時に添加するとタンパク質の増加は相加的であったことから、両ホルモンは独立した作用でタンパク質の合成を促進する可能性が示された。
続いて、シグナル伝達経路の阻害剤を添加したところ、20E による作用は MAPK 経路の阻害剤で阻害され、BIGFLP による作用はインスリンシグナル経路の阻害剤で阻害された。また、20E は MAPK 経路の構成因子である ERK のリン酸化を促進し、BIGFLP はインスリンシグナルの構成因子である AKT のリン酸化を促進した。さらに、免疫染色の結果、BIGFLP による AKT のリン酸化は組織全体で検出された。一方、20E 無添加条件では予定貯精嚢領域でリン酸化 ERK が見られたが、20E を添加すると、予定外部生殖器領域でも ERK のリン酸化が見られた。

【結論】
本研究により、20E と BIGFLP はそれぞれ異なる機構で生殖器原基の成長発達を促進することが示された。両ホルモンの協調的な作用により、蛹期に成虫原基が劇的に成長できると考えられる。

*Bombyx mori*, 20-hydroxyecdysone, Insulin-like growth factor

発表責任者：藤永大輝（8867307718@edu.k.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4A02a05
講演日時：3 月 20 日 10:20～ A 校舎 02 会場

# 近赤外生物発光材料の生体内イメージングにおける有用性

# Advantage of NIR bioluminescence for in vivo imaging

○北田 昇雄[1]、木山 正啓[1]、齊藤 亮平[1]、岩野 智[2]、丹羽 治樹[1]、平野 誉[1]、牧 昌次郎[1]([1]電気通信大学、[2]理研)
○Nobuo KITADA[1], Masahiro KIYAMA[1], Ryohei SAITO[1], Satoshi IWANO[2], Haruki NIWA[1], Takashi HIRANO[1], Shojiro MAKI[1] ([1]UEC, [2]RIKEN)

ホタル生物発光は、発光基質ホタルルシフェリンが発光酵素ホタルルシフェラーゼにより AMP 化され、続いて酸素化されることで、黄緑色（λmax = 560 nm）の発光を示す。ホタル発光系の非常に高効率（φBL = 0.41）な発光を活かして、ライフサイエンスの分野で応用されている。
当研究室では、ルシフェリンの構造を改変することで可視光をほぼ網羅するような発光色を実現した(430～700 nm)。ホタルの黄緑色の発光は生体組織に吸収されやすいが、「生体の窓」とも呼ばれる近赤外領域（650～900 nm）ならば生体透過性が高く、生体イメージング材料への応用に望ましい。この当研究室で創製した多色化技術から、世界初の近赤外自発光材料アカルミネ® [和光純薬工業]（λmax = 675 nm）や、さらに水溶性を高めた高水溶性発光材料 TokeOni [Sigma Ardlich]（λmax = 675 nm）を製品化している。
イメージングの技術は日々進歩しているものの、いまだにマウス等の小動物を用いたイメージング実験が主流である。今後、最先端医療の研究を進めるにあたり、マウスやラットではなく、マーモセットやミニブタ等のさらに大型の動物での実験が必要不可欠となる。しかしながらこれらの中大型動物を用いた発光イメージングに最適化されているシステムが無かったため、実際に行われた例はない。そこで今回はこれらの近赤外生物発光材料が生体内イメージングにどれほど有用性を示すのか in vitro 実験、透過性実験、in vivo 実験を通して確認した。本会にてこの詳細について発表する。

in vivo imaging, Bioluminescence, Luciferin

発表責任者：北田昇雄（kitada@lumi.pc.uec.ac.jp）

講演番号：4A02a06
講演日時：3 月 20 日 10:35～ A 校舎 02 会場

*Bactrocera* 属ミバエの化学感覚受容体の同定と発現組織の解析
Identification and expression pattern of the chemosensory receptor genes in the three *Bactrocera* fruit flies

○宮崎 仁実、大竹 潤、吉永 直子、森 直樹、西田 律夫、小野 肇（京大院農）
○Hitomi MIYAZAKI, Jun OTAKE, Naoko YOSHINAGA, Naoki MORI, Ritsuo NISHIDA, Hajime ONO (Kyoto Univ.)

（目的）

*Bactrocera* 属ミバエには幼虫の食害により果実を腐敗させ，農業生産に多大な被害をもたらす種が数多く存在する．同属のミカンコミバエ，ウリミバエ，ナスミバエは日本でも警戒されている重要害虫である．この 3 種は，雄成虫が特定の植物由来の特定の化合物に誘引された後，これらの物質を摂食し性フェロモン生合成の原料として利用する．また雌成虫が植物の葉や果物が出す匂いを適切な寄主の探索に利用する例も報告されており，ミバエにおいては匂いや味の化学受容が生態上重要な意味を持っている．一般に昆虫においては，嗅覚受容体（OR: odorant receptor），味覚受容体，イオノトロピック受容体が化学感覚受容体として知られている．本研究ではミバエの生態上重要な誘引物質の受容機構を解明するため，応答機構が解明されている OR に注目して，ミバエ 3 種の受容体遺伝子を探索した．

（方法・結果）

3 種のミバエ（ミカンコミバエ，ウリミバエ，ナスミバエ）の雌雄について，触角及び唇弁から抽出した total RNA を元にライブラリーを作成し，paired-end シーケンスに供した．得られた read をアセンブリ後，BLAST でショウジョウバエの OR アミノ酸配列と相同性を比較したところ，3 種のミバエ全てから 40 種以上の OR を同定した．その後 read 数と塩基数から算出した発現量を比較した．その結果，雌雄で有意な差がある OR 遺伝子は見出せなかったものの，触角での発現量が大きい OR や，唇弁でも発現している OR が存在することを発見した．また qPCR によってウリミバエとナスミバエについては，数種類の OR 及び ORCO (odorant receptor coreceptor) が唇弁でも発現していることを確認した．これまでに双翅目昆虫では OR が触角と小顎髭といった嗅覚器官でのみ発現することが報告されている．しかし味覚器官である唇弁でもミバエの OR が発現していたため，ミバエは OR によって匂い物質を味としても受容している可能性が示唆された. 特定の化合物に対してミバエは, 離れた場所にいる時は嗅覚で感知し, 近くにいる時は味として受容しているのかもしれない.

3 種ミバエの OR 発現種数

| | ミカンコミバエ | | ナスミバエ | | ウリミバエ | | *Drosophila melanogaster* | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 触角 | 唇弁 | 触角 | 唇弁 | 触角 | 唇弁 | 触角 | 唇弁 |
| OR 発現種数 | 56 | 21 | 55 | 7 | 49 | 0 | 41 | 0 |

*Bactrocera*, chemosensory receptor, odorant receptor

講演番号：4A02a07
講演日時：3 月 20 日 11:00～ A 校舎 02 会場

カイコ（*Bombyx mori*）幼虫における摂食行動制御因子アラトトロピン及び GSRYamide の機能解析
Functional analyses of allatotropin and GSRYamide regulating feeding behavior in the silkworm, *Bombyx mori*

○松本 澄洋、永田 晋治（東大院・新領域・先端生命科学）
○Sumihiro MATSUMOTO, Shinji NAGATA (Grad. Sch. of Fro. Sci., the Univ. of Tokyo)

【目的】

カイコ(*Bombyx mori*)幼虫は、一定環境下で飼育すると、約 2 時間周期の「食べる、食べない」の摂食行動を観察できるが、この現象は内分泌系により制御されていると考えられる。これまで我々は、カイコ幼虫の摂食行動を制御する生理活性分子として、いくつかのペプチド性因子を同定してきた。腸管由来の分子としては、カイコ 5 齢幼虫 500 個体分の中腸粗抽出物から、アラトトロピン(AT)、および新規ペプチドである GSRYamide を同定した。RT-PCR による組織別発現解析では、両ペプチドは、中腸や後腸をはじめとする腸管の他に、中枢神経系にも発現しており、いわゆる脳腸ペプチドであることを確認した。これらの結果は、アラトトロピン(AT)や GSRYamide が、カイコ幼虫体内において摂食行動を制御する機能を有していることを示唆する。しかし、同定したこれらのペプチドが生体内でどのように作用しているかは、未だに明らかになっていない。そこで、本研究では、アラトトロピン(AT)、および GSRYamide が、摂食行動に関わる腸管の自律的な蠕動運動に与える影響を解析し、摂食行動制御とどのように関連しているかを見出すことを目的とした。

【方法・結果】

AT および GSRYamide の機能解析にあたり、カイコ幼虫の腸管の自律運動への影響を、それぞれの合成ペプチドを用いて検討した。腸管の蠕動運動の評価系としては、Image J をもとにした画像解析ソフトである Kymograph を用いた。カイコ幼虫は開腹した状態でも、リンガー液中で長時間の腸管の蠕動運動が実体顕微鏡下で観察できる。そこで、この腸管の蠕動運動をビデオ撮影し、Kyomograph にて運動の経時的な変化を可視化し、計測した。なお、蠕動運動の活性は、リンガー液滴下後 60 秒間の収縮回数と、サンプルを含むリンガー液を投与後の収縮回数の比を、「収縮頻度」と定義して評価することにした。この方法を用い、AT を腸管に投与した場合、前腸前半(咽頭)部分の蠕動運動、および後腸の前半部分(第一狭窄部付近)の蠕動運動の収縮頻度が、それぞれ濃度依存的に低下した。また、GSRYamide を投与した場合にも、AT と同様に濃度依存的に収縮頻度が低下した。ところが、前腸の咽頭部分の蠕動運動に関しては、絶食状態の個体由来の腸管を用いた場合では、GSRYamide に対する濃度依存的な収縮頻度低下の活性は認められなかった。これらの結果は、カイコ幼虫において、AT および GSRYamide が摂食状態に応答し、前腸や後腸の自律的な蠕動運動を制御することで摂食行動を調節していることが示された。

*Bombyx mori*, GSRYamide, contraction

講演番号：4A02a08
講演日時：3 月 20 日 11:15～ A 校舎 02 会場

Effects of Crustacean Cardioactive peptide (CCAP) on feeding behavior in the two-spotted crickets, *Gryllus bimaclatus*

○Yijun ZHOU, Shinji NAGATA (Grad. Sch. of Fro. Sci., the Univ. of Tokyo)

【目的】Crustacean cardioactive peptide (CCAP) is a nonapeptide, originally identified in crustacean as a cardio-accelerator and highly conserved among arthropods including insects. CCAP has been demonstrated to be functional in various biological processes, such as ecdysis, hindgut construction as well as cardio-acceleration. In terms of interplay among endocrinal control, CCAP has been proved to be a releasing factor of adipokinetic hormone (AKH) in several insect species. As AKH is involved in the modulation of physiological metabolisms and feeding behavior, CCAP is consequently considered to contributing to maintaining energy homeostasis. However, the mode of CCAP action remains unknown, neither do the regulatory mechanisms in feeding bahaviors cleared. We here report how CCAP affects the metabolic states and feeding behavior by identification and characterization in the two-spotted cricket, *Gryllus bimaculatus*.

【実験 結果】First, we identified contigs including the cDNAs sequences encoding CCAP and its receptors in crickets by BLAST search in the RNA-sequencing data derived from crickets different tissues. RT-PCR verified that CCAP is expressed mainly in the central nervous system, CCAP receptors (CCAPR) are also expressed in the gut, while little transcript of CCAPR is observed in corpora cardiaca, where AKH is produced and released in this species. Those expression patterns indicated low possibility of involvement of AKH signaling in CCAP functions in this species. To address the metabolic function via CCAP signaling, we next prepared chemically synthetic CCAP using Fmoc Solid Phase Synthesis. Injection of synthetic CCAP to adult crickets (3 days after molting) showed significant decreases of food intake and carbohydrate concentration, indicating that CCAP is involved in the regulatory mechanisms in feeding behavior. In addition, to investigate the physiological function by using RNA inference (RNAi), we prepared double strand RNA (dsRNA) encoding CCAPR for knockdown the function of CCAP. The results turned to be a significant increase of food intake and carbohydrate concentration. These phenotypic results strongly indicate the regulatory role of CCAP in feeding behaviors, possibly maintaining metabolic homeostasis in the crickets. Furthermore, the results imply that in crickets, CCAP may be not directly contained in the AKH signaling.

CCAP, neuropeptide, homeostasis

講演番号：4A02a09
講演日時：3 月 20 日 11:30～ A 校舎 02 会場

フタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* における卵巣摘出による摂食行動変化と脂肪体の転写変動解析
Analysis of feeding behavior of ovariectomized females and transcriptome analysis of their fat body in the two-spotted cricket, *Gryllus bimaculatus*
○塚本 悠介、永田 晋治（東大院・新領域・先端生命科学）
○Yusuke TSUKAMOTO, Shinji NAGATA (Graduate School of Frontier Sciences, the University of Tokyo)

【目的】昆虫のメスの成虫は、交尾により摂食量や栄養選好性が変化する。これまでに私たちは、選好性摂食行動の解析法であるジオメトリックフレームワーク(GFW)解析法を用いて、フタホシコオロギ*Gryllus bimaculatus*では、交尾後のメスは栄養選好性が変化し、処女メスに比べタンパク質を顕著に多く摂食することを明らかにした。また、フタホシコオロギは、交尾後に産卵数が増加し、その後、次の産卵に向けて体内で卵を形成する。そのため、交尾後のタンパク質選好的な摂食行動は、産卵行動と関わっていると予想された。しかし、これらの制御機構に体内のどのような分子が関わっているかは明らかにされていないのが現状である。そこで、交尾後のタンパク質選好的な摂食行動のメカニズムを分子レベルで明らかにするために、先ず、交尾後のタンパク質選好的な摂食行動と産卵行動・卵形成とが関連しているのかを代謝系に着目しつつ明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】先ず、産卵行動が栄養選好性と関わるかを明らかにするため、フタホシコオロギのメスの成虫を用いて卵が形成しない個体の作出を試みた。実際には、メスの成虫から、未発達の段階の卵巣を外科的に摘出した個体(OVX)を作出した。OVXは、施術後数週間は通常飼育が可能であり、その間は、交尾行動はするものの産卵行動および体内での卵形成が認められなかった。続いて、このOVXを用いて、交尾後の栄養選好性の変化と産卵行動・卵形成との関連性をGFW解析法により分析した。その結果、OVXは、交尾の有無に関わらず、疑施術後の処女メスに比べて、顕著にタンパク質選好的な摂食行動が認められた。つまり、卵巣の除去により、交尾後のメスと同様に、タンパク質選好的な摂食行動となることが明らかとなった。次に、このOVXの代謝系に異常が認められるかを検討するため、まず体内の各組織を観察した。その結果、OVXにおいて、体内の脂肪体が増加していることが明らかになった。また、ナイルレッド染色による観察では、OVXの脂肪体における顕著な脂肪滴の蓄積が認められた。すなわち、OVXの脂肪体において、代謝系に異常があることが示唆された。そこで、OVXおよび通常飼育のメスの脂肪体由来のtotal RNAを用いて、RNA-sequencing解析によるトランスクリプトーム解析を行った。その結果、得られた約9.4万のContigのうち、700程度のContigが卵巣を除いたメスと、健康なメスで発現量が顕著に異なっていた。例えば、脂肪鎖伸長に関わるElovl6など脂質代謝系の遺伝子にも変動が認められたことから、卵巣の摘出により、脂肪体における代謝系に異常が生じていることが分かった。つまり、交尾後に認められるタンパク質選好的な摂食行動は代謝系の変化によるものであることが示唆された。

feeding behavior, *Gryllus bimaculatus*, ovariectomy

講演番号：4A02a10
講演日時：3 月 20 日 11:45～ A 校舎 02 会場

フタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* における異なる脂肪酸間での経時的な選好性行動解析
Fluctuation in feeding preference of fatty acids in the two-spotted cricket, *Gryllus bimaculatus*
○福村 圭介、永田 晋治（東大院・新領域・先端生命科学）
○Keisuke FUKUMURA, Shinji NAGATA (Grad. Sch. of Fro. Sci., the Univ. of Tokyo)

【目的】私たちは、フタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* を用いて、内分泌系により変化する代謝構造が与える摂食行動への影響を研究してきた。これまでに、脂質動員ホルモン受容体(AKHR)を RNA 干渉法(RNAi)でノックダウンしたコオロギでは、体液中の不飽和脂肪酸の割合が顕著に減少することを見い出した。さらに、AKHR をノックダウンしたコオロギでは、不飽和脂肪酸を顕著に選好するような摂食行動が認められた。そこで、本発表では、選好性摂食行動の評価系として、ビデオモニタリングを用いて長時間の連続撮影による経時的行動解析システムを構築することを目的とした。また、構築した行動解析系により、様々な脂肪酸に対する選好性行動を解析した。
【方法・結果】フタホシコオロギを用いて、異なる栄養分に対する選好性摂食行動を解析するため、2 種の人工飼料を提示する Two-choice アッセイを行った。行動解析は、フタホシコオロギ 1 頭を円形の容器に入れ 2 種の人工飼料を提示後、ビデオで 9 時間撮影し、それぞれの人工飼料の選択回数を異なる栄養分への選好性とした。実際には、Image J を用いて、コオロギの全行動の軌跡解析を行い、得られた 9 時間分の映像データから各餌にアクセスした回数を選択回数として算出した。また、人工飼料としては、タンパク質および糖質成分として、それぞれカゼイン、デキストリンを添加したものを使用した。脂質成分には、異なる炭素鎖長および不飽和度の脂肪酸を用いて人工飼料を調合した。これらの解析方法および人工飼料を用いて、先ず、異なる炭素鎖長の飽和脂肪酸であるパルミチン酸(16:0)とステアリン酸(18:0)への選好性行動を解析した。その結果、18:0 への摂食回数が 16:0 に比べ顕著に多かった。続いて、不飽和度の異なる炭素鎖長 18 の脂肪酸 18:0、オレイン酸(18:1)、およびリノール酸(18:2)のうち 2 種を用いて解析した。その結果、18:0 と 18:1 の間では選好性に差は認められなかったが、18:2 への選好性は 18:0 および 18:1 に比べてそれぞれ顕著に低かった。これらの結果から、フタホシコオロギは脂肪酸の炭素鎖長および不飽和度を識別し、選択的に摂食することが分かった。さらに、Two-choice アッセイ 9 時間分の映像データから 1 時間毎の選択回数を算出したところ、各脂肪酸への選択回数は時間毎に大きく変動することが分かった。つまり、各脂肪酸への選好性は経時的に変動することが示唆された。以上の結果から、本研究で構築したビデオモニタリングによる行動解析システムを用いることにより、選好性摂食行動を経時的に評価することが可能となった。

*Gryllus bimaculatus*, Feeding preference, Dietary fatty acids

講演番号：4A02a11
講演日時：3 月 20 日 12:00～ A 校舎 02 会場

フタホシコオロギの捕食行動における異種個体の認識
Interspecies recognition in predatory behavior by the two-spotted cricket *Gryllus bimaculatus*
○吉國 大稀、森山 俊、永田 普治（東大）
○Hiroki YOSHIKUNI, Takashi MORIYAMA, Shinji NAGATA (The University of Tokyo)

【目的】生物は餌を食べる行動の第一段階として、餌を或る知覚として認識する。昆虫の場合は、触角により餌を認識する場合が多く、主に餌表面の化学物質で食べられるか否かが判断されていると考えられている。餌が住環境となっている植食性の昆虫種とは異なり、肉食性および雑食性の昆虫種の場合は、主に触角により餌を判断する。この際、同種の他個体に対しての食行動は、ほとんどの種で抑制的である。つまり、触角による判断で、同種の個体は餌の可能性が却下される。このように、自然界で良くみられる同種と異種の個体識別に関しては、これまでに分子レベルでの研究はあまり行われていない。そこで、本研究では、雑食性で攻撃性の高い直翅目昆虫であるフタホシコオロギ Gryllus bimaculatus を用いて、同種と他種の認識がどのように行われ、捕食の選択が決定されるのかを明らかにすることを最終目標とし、本年度は、フタホシコオロギが他種の個体を認識する生理学的な知見を得ることを目的とした。
【方法・結果】まず、フタホシコオロギと他種の個体の２つを、フタホシコオロギの別の個体に提示し、どちらを選択し餌とし捕食するのかを検討した。提示した対象昆虫種は、トノサマバッタ、ツチイナゴ、ツユムシ、エンマコオロギなどの直翅目昆虫 8 種、およびトンボ目 1 種とした。また、提示する際には、逃避行動や闘争行動をなるべく排除するため、足部を切除し底面に貼り付けた。対象区としては、フタホシコオロギを同様に処理したものを提示した。また、すぐに捕食行動が見られるように、フタホシコオロギは 24 時間絶食させた成虫の個体を用いた。その結果、フタホシコオロギと同亜科であるエンマコオロギを除いた 8 種に対し、選択的な捕食行動が顕著に惹起された。また、実験中にフタホシコオロギは捕食行動の第一段階として、触角で対象昆虫の表面をタッピングする行動が観察された。そこで、触角を除去したフタホシコオロギの個体を用いて、捕食行動を観察したところ、他種への選択的な捕食行動が見られなくなった。次に、体表の主成分である炭化水素に着目し、被捕食個体の体表ワックスを有機溶媒で取り除き、それらに対する捕食行動を観察した。その結果、触角の除去と同様に、他種への選択的な捕食行動が見られなくなった。以上の結果から、フタホシコオロギは、体表ワックスを種の識別の主要な因子として、触角を介して同種あるいは異種を識別していることが示唆された。

feeding behavior, *Gryllus bimaculatus*, cuticular wax

発表責任者：吉國大稀（6804211624@edu.k.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4A02a12
講演日時：3 月 20 日 12:15～ A 校舎 02 会場

ABCA1 依存的 HDL 形成におけるステロール分子特異性と膜ドメイン
Sterol molecule specificity and potential membrane domain for ABCA1-dependent HDL assembly
○山内 祥生[1]、横山 信治[2]、CHANG Ta-Yuan[3]（[1]東大農、[2]中部大応生、[3]ダートマス大医）
○Yoshio YAMAUCHI[1], Shinji YOKOYAMA[2], Ta-Yuan CHANG[3]（[1]Univ. Tokyo, [2]Chubu Univ., [3]Dartmouth Med. Sch.）

【背景と目的】
High-density lipoprotein（HDL）レベルは、冠動脈疾患の発症と負の相関を示し、抗動脈硬化因子として広く認識されている。HDL 欠損症タンジール病の原因遺伝子として *ABCA1* 遺伝子が同定され、ATP-binding cassette transporter A1 （ABCA1）が HDL 形成に必須の分子として着目されている。ABCA1 は apolipoprotein A-I（apoA-I）による細胞からのリン脂質とコレステロールの放出並びに、それに伴う HDL 形成を仲介しているが、その反応機序は不明な点が多い。HDL にはコレステロール以外にコレステロール合成過程で産生される前駆体ステロールも少量含まれていることが知られている。本研究では、ABCA1 依存的な HDL 形成におけるステロール分子特異性を解析するとともに、そのステロール分子特異性から ABCA1 依存的な HDL 形成に関与する膜ドメインの同定を試みた。
【方法と結果】
ABCA1 発現細胞を apoA-I と培養した後､培養液中に放出されたステロールを GC-MS にて解析した。その結果、少量ではあるが、コレステロール以外に様々な前駆体ステロールの放出が確認された。中でも、コレステロール合成経路で最初に合成されるステロールであるラノステロールの放出が顕著に認められた。放射能標識酢酸を用いた解析から、ABCA1 は新規合成された前駆体ステロールをより積極的に放出することが示された。ABCA1 タンパク質の細胞内局在を調べたところ、ABCA1 は Triton X-100 には可溶性を示すが、Brij 98 には不溶性の膜ドメインに局在することが示された。さらに、新規合成された前駆体ステロールも Brij 98 不溶性膜画分に回収された。しかしながら、新規合成前駆体ステロールは合成後、1 時間以内に Brij 98 不溶性膜画分から消失し、コレステロールに変換された。
【結論】
以上の結果から、新規合成された前駆体ステロールは合成後直ちに ABCA1 が局在する特定の細胞膜ドメインに輸送された後、ABCA1 によって細胞外に放出されること示唆された。また、この膜ドメインが ABCA1 依存的な HDL 形成の場として機能していることが示唆された。

ABCA1, cholesterol, HDL

発表責任者：山内祥生（a-yoshio@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4A03a01
講演日時：3 月 20 日 09:20～ A 校舎 03 会場

# カテキン類の化学酸化反応を活用した簡便な新染毛法

# Novel Hair Colouring Technique by Utilising Chemical Oxidation of Catechins

○櫻井 千寛、渡邊 克樹、松原 孝典（産業技術短期大学）
○ Chihiro SAKURAI, Katsuki WATANABE, Takanori MATSUBARA (College of Industrial Technology)

【目的】染毛（毛髪の染色・ヘアカラーリング）において、酸化染毛剤の使用がほとんどであるが、酸化染毛剤の構成成分には危険性の高い化学物質が含まれている。それが原因で頭皮のかぶれ等の皮膚炎や、重篤な場合にはアナフィラキシーが起こる等の人体被害が知られている。そこで発表者らは、人体負荷が比較的小さいカテキン類を用いた染毛に取り組んできた。本発表では、カテキン類が多く含まれるチャ抽出物を用いて、その酸化反応を活用した染毛について報告する。
【方法】チャ抽出物サンフェノン 90S（SP 90S）を次の 3 手法で酸化して、損傷度の異なる 2 種類の白髪人毛（白髪 M・白髪 B；損傷度は白髪 M の方が高い）を染色した。染色方法は、チャ抽出物水溶液で白髪人毛を処理（吸着処理）した後に、その溶液から毛髪を取り出し、次の酸化溶液で処理（酸化処理）をして染毛した。① $O_2$ ガスを十分に供給した 0.1 M 炭酸ナトリウム水溶液（pH > 11）（$O_2$ 法）、② 0.6 wt% $H_2O_2$／1 M モノエタノールアミン水溶液（pH = 9.5）（$H_2O_2$ 法）、③ 10 mM 過ヨウ素酸ナトリウム水溶液（pH = 7.0）（$NaIO_4$ 法）の 3 種類を用いて、それぞれ処理した。その後、洗浄および乾燥処理を行って染色毛髪を得た。$NaIO_4$ 法では、染色条件と染色の程度（染色性）の関係を調べ、最適な染色条件を見出した。また、洗髪に対する色落ち（洗髪堅ろう度）を調べた。
【結果】$O_2$ 法で染毛すると、白髪 M は濃い茶色に、白髪 B は淡い茶色となった。ただし、$O_2$ 法では外部から $O_2$ ガスを供給する必要があり、酸化溶液の pH が高く、毛髪の損傷を引き起こすため、実用には向かない。そこで、酸化染毛剤でも利用される $H_2O_2$ 法で染毛試験した。$H_2O_2$ 法で処理すると、色素形成は起こったが、同時に脱色反応も起こった。そのため、結果として $H_2O_2$ 法で染毛はできなかった。次に、脱色作用がなく、色素形成のみを引き起こす酸化剤である $NaIO_4$ 法を試みた。その結果、$O_2$ 系と同様の色に白髪 M および白髪 B が染色された。pH 7 の酸化処理であり、$O_2$ ガス供給のような実用上問題のある方法ではない。さらに、$NaIO_4$ 法における染色条件と染色性の関係を調べた結果、吸着温度および吸着時間が長いほど、濃色に白髪人毛は染まった。吸着および酸化 pH は染色性にあまり影響を与えなかった。洗髪堅ろう度試験を行ったところ、$O_2$ 法および $NaIO_4$ 法で染毛した毛髪は、14 回洗髪しても見た目に大きな変化はないことが分かった。市販の酸化染毛剤で染毛した毛髪よりも色の変化はやや大きいが、他の市販の酸性染毛料や塩基性染毛料で染毛した毛髪より色の変化は小さい。

hair colouring, catechins, oxidation

発表責任者：松原孝典（matsubara@cit.sangitan.ac.jp）

講演番号：4A03a02
講演日時：3 月 20 日 09:35～ A 校舎 03 会場

ポリフェノール類の酸化反応を用いた絹の新染色法
New dyeing technique for silk fabrics by using oxidation of polyphenols
○岡田 魁斗、松原 孝典（産業技術短期大学）
○Kaito OKADA, Takanori MATSUBARA (College of Industrial Technology)

【目的】染色産業は、河川への大量の廃液の流出・高温多湿の劣悪な労働環境・エネルギーの大量消費等の問題があり、これらを解決する事は地球環境や人類のために大きな意義を持つ。本研究では、低温（室温付近）・短時間（数時間程度）の環境面に配慮する絹の濃色染色法の開発に取り組み、ポリフェノール類の酸化反応による色素化を活用する酸化染色法を見出した。本発表では、(+)-カテキンを用いた酸化染色法と従来の金属媒染法を比較し、染色条件と染色法の関係を報告する。
【方法】金属媒染法では、4 × 4 $cm^2$ の絹布 5 枚を 10 mM (+)-カテキン水溶液 100 ml に浸漬（30 °C・40 分）し、処理布帛を取出して $KAl(SO_4)_2$・$CuSO_4$・乳酸 Fe(II)・クエン酸 Fe(III) 水溶液にそれぞれ投入し、染色した（以下、それぞれ $Al^{3+}$系・$Cu^{2+}$系・$Fe^{2+}$系・$Fe^{3+}$系）。酸化染色法では、吸着過程と酸化過程の 2 段階で染色した。吸着過程では、10 mM (+)-カテキン水溶液 100 ml に絹布帛を 5 枚投入して処理した（30 °C・40 分）。酸化過程は、次の 2 手法である。一方は、事前に $O_2$ ガス供給を十分に行った 0.1 M 炭酸ナトリウム水溶液に吸着処理布帛を浸漬し（30 °C・40 分）、$O_2$ ガスを供給しながら染色した（以下、$O_2$ 系）。他方は、吸着処理布帛を 10 mM 過ヨウ素酸ナトリウム水溶液に浸漬して（30 °C・40 分）、染色をした（以下、$NaIO_4$ 系）。染色布帛は、洗浄・乾燥を行い、分光測色計で $K/S_{tot}$ 値を測定した。
【結果】従来法の金属媒染法は(+)-カテキンと金属イオンの錯体形成反応による色素生成を利用した染色法である。30 °C で計 80 分間の処理を行うと $Al^{3+}$系は淡い橙色、$Cu^{2+}$系は淡い褐色、$Fe^{2+}$系は灰色、$Fe^{3+}$系は淡い茶色と $Fe^{2+}$系を除き、絹布帛は濃色に染まらなかった。一方で、新しい染色法である酸化染色法では、$O_2$ 系は淡い茶色となったが、$NaIO_4$ 系は濃い茶色に絹布帛が染色された。いずれの方法も事前に吸着させた(+)-カテキンの酸化反応による色素形成を利用したものであるが、$O_2$ 系は緩やかに酸化反応が進行し、布帛の色が徐々に変化したことに対し、$NaIO_4$ 系では酸化処理開始直後に布帛は濃色となり、染色された。染色性と相関する $K/S_{tot}$ 値は、$Al^{3+}$系 ＜ $Cu^{2+}$系 ＜ $O_2$ 系 ＜ $Fe^{3+}$系 ＜ $Fe^{2+}$系 << $NaIO_4$ 系の順で大きく、30°C で 80 分間という処理ではあるが、$NaIO_4$ 系を用いることで、低温でも濃色に染色できることが見出された。これは、$NaIO_4$ 系が他の系に比べ、絹布帛中に吸着した(+)-カテキンの色素化反応が非常に速いためと考えられる。さらに、染色条件と染色性の関係を調べた結果、吸着温度 30 °C・吸着 pH 6.2・吸着時間 5 分以上・酸化 pH 7.7・酸化時間 20 分以上が最適条件であることが分かった。

dyeing of silk, (+)-catechin, oxidation

発表責任者：松原孝典（matsubara@cit.sangitan.ac.jp）

講演番号：4A03a03
講演日時：3 月 20 日 09:50～ A 校舎 03 会場

テアフラビン類によるリン脂質リポソームの不溶化と胆汁酸による再分散
Theaflavin-induced precipitation of liposomes and their redispersion by subsequent addition of bile acid.
○中山 勉、猿渡 晃介、森 名丘、奈良井 朝子（日獣大　応生科）
○Tsutomu NAKAYAMA, Kousuke SARUWATARI, Natsumi MORI, Asako NARAI (Nippon Veterinary and Life Science Univ.)

【背景・目的】　紅茶に含まれるテアフラビン(TF)類は、茶葉由来のポリフェノール酸化酵素によって酸化されたカテキン類が 2 分子で重合して生成する赤橙色色素である。TF 類には構成要素であるカテキン類の違いから構造の異なる 4 種類（TF1, TF2A, TF2B, TF3）が存在する。近年、TF 類のうち TF2A に特異的なコレステロール吸収抑制作用が報告されたことから、演者らは、消化管における脂質やコレステロール吸収に不可欠なリン脂質–胆汁酸ミセルをホスファチジルコリン(PC)とタウロコール酸を用いて調製し、TF 類との相互作用について調べた。その結果、TF2A を添加したミセル分散液において、PC 濃度に依存的に TF2A を含む不溶性沈殿物を生じることを見出した（2016 年度日本農芸化学会関東支部大会にて発表)。次に、胆汁酸濃度の影響を調べるために、胆汁酸を含まない PC リポソームに TF 類を作用させたところ、興味深い現象を見出したので報告する。

【方法】　リン酸ナトリウム緩衝液（pH 6.5）中で PC 乳濁液を調製し、超音波処理後、20,000×*g*, 10 分間の遠心によって均一なリポソーム分散液を得た。コリン定量をおこない PC 濃度を 3 mM に調整し、そこへ TF 類をそれぞれ 0.5 mM になるように添加した後、37℃で 30 分間インキュベートした。続いて 1／5 量の 36 mM タウロコール酸ナトリウム溶液を添加し（最終濃度 6 mM)、さらに 37℃で 30 分間インキュベートした。この試料を遠心分離して得られた上清に含まれる TF 類を RP-HPLC で分析した。

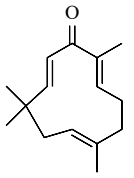
【結果】　リポソーム分散液に TF 類を添加すると、全ての TF 類試料において赤橙色の沈殿物が形成され、上清中の TF 濃度は低下した（上清中の濃度：TF2A, 3＜TF2B＜＜TF1)。続いてタウロコール酸を添加してインキュベートしたところ、TF1, 2B, 3 は沈殿物が溶解して上清中の TF 濃度が上昇した。一方、TF2A については沈殿物が溶解せず、上清中の TF2A 濃度は変わらなかった。現在、上清または沈殿中の PC 定量をおこない、PC と TF2A の間の stoichiometry や相互作用機構の解析を進めている。他の脂質成分が共存した場合の影響なども調べ、TF2A に特異的なコレステロール吸収抑制作用との関係を明らかにしたい。

theaflavin, phospholipid, bile acid

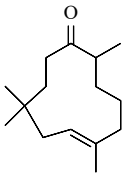
講演番号：4A03a04
講演日時：3 月 20 日 10:05～ A 校舎 03 会場

香気成分・Zerumbone 類縁体の Baeyer-Villiger 酸化
Baeyer-Villiger oxidation of zerumbone analogues
○芦田 久美子、北山 隆（近畿大院・農・バイオ）
○Kumiko ASHIDA, Takashi KITAYAMA (Major. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agric. Kindai Univ.)

**【緒言】**



Zerumbone



2,3,10,11-Tetrahydrozerumbone

ハナショウガ (*Zingiber zerumbet* Smith) の根茎部が乾燥重量当たり 3～4% (精油中 80～90%) 含有する 11 員環フムレン型セスキテルペンであるゼルンボンは、水蒸気蒸留により簡便に単離することができる。共役二重結合、孤立二重結合、カルボニル基をもち非常に高い反応性を示すことから「多様な反応性をもつ天然材料を利用した有機合成 (*NMRDOS*) 」の材料として優れている。またゼルンボンは多様な生理活性を発現することが多数報告されており、ゼルンボンが独特な草様の香気を示すことも生理機能の一つとして挙げられる。さらにその位置選択的還元体である 2,3,10,11-テトラヒドロゼルンボンがアンバー様の香気を示し、その主成分は 2*R* 体であること、そして 2*S* 体もハッカ様の香気を示すことを当研究室で明らかとした [1, 2]。このようにゼルンボンの僅かな構造の違いが香気に大きな影響を与えることが明らかとなったため、ゼルンボンをリード化合物とした誘導化によって、多様な香気成分の開発が期待できる。そこで本研究ではゼルンボン骨格へのエステル基の導入について検討した。

【結果】

環状ケトンへのラクトン基導入には Baeyer-Villiger 酸化が一般的に用いられているため、多置換型環状ケトンであるゼルンボンおよびゼルンボン誘導体についても同反応について検討した。種々の酸化剤を用いて Baeyer-Villiger 酸化について検討したところ、*m*CPBA を用いたときに良好に反応が進行することが分かったため、詳細に反応解析することとした。その結果、用いる基質の骨格によって反応性が大きく異なることが明らかとなった。すなわち 2,3,10,11-テトラヒドロゼルンボンを基質に用いると比較的容易に位置選択的に酸化が進行すること、および基質濃度が反応速度に大きな影響を与えることが明らかとなった。さらに、環の大きさや官能基の有無という環構造の変化により反応性が劇的に変化することを見いだした。

1. Kitayama, T. et al. *Tetrahedron; Asymmetry,* **2010**, *21*, 11–15
2. Kitayama, T. et al. *Tetrahedron; Asymmetry,* **2012**, *23*, 1490–1495

zerumbone, Baeyer-Villiger oxidation, cyclic ketone

発表責任者：北山隆（kitayama@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：4A03a05
講演日時：3 月 20 日 10:20～ A 校舎 03 会場

# SanCat$^{R}$ によるキラルな香料素材の調製

# Preparation of chiral aroma compounds by SanCat$^{R}$

○松尾 弘武[1]、大塚 舜人[1]、永岡 宏行[2]、赤壁 善彦[1] ([1]山口大学大学院 創成科学研究科、[2]サンヨー食品(株))
○Hiromu Matsuo[1], Kiyohito Otsuka[1], Hiroyuki Nagaoka[2], Yoshihiko Akakabe[1] ([1]Yamaguchi Univ. Graduate school of Science and Technology for Innovation, [2]Sanyo Shokuhin Co., Ltd, & D)

【背景・目的】
生体触媒は実験室での利用のみならず、工業的に化学、医薬、香料などの製造に用いられている。近年、エンドウ豆由来の鉄結合タンパク質(SanCat®)により第 2 級アルコールである 1-(6-methoxy-2-naphthyl)ethanol の(*R*)-立体選択的な不斉酸化が報告された。この反応は水系で行うことができ、特に、NAD(P)などの補酵素の添加を必要としない。ところで、花や食品の香気にはキラルな第 2 級アルコールが含まれており、鏡像異性体間で香気特徴が異なる場合や、それらが全体の香気に寄与していることが考えられる。そこで、本研究ではキラルな香料素材の新たな調製方法を目的として、第 2 級アルコールである α-ionol および β-ionol を基質とした SanCat®による不斉酸化を試みた。

【方法】
50mM glycine-NaOH buffer(pH 9.0)を調製し、SanCat®を加え酸素下で一日撹拌した後、2-propanol に溶解したラセミの α-ionol あるいは β-ionol を基質として加え不斉酸化を行った。その後、未反応の α-ionol および β-ionol を回収し、無水酢酸でアセチル化を行い、chiral GC を用いて立体配置ならびに光学純度を決定した。

【結果】
SanCat®による不斉酸化の結果、3 週間程度の反応で 50%近い変換率により、α-ionol および β-ionol が、α-ionone、β-ionone へと変換された。反応後、回収した α-ionol および β-ionol を無水酢酸を用いて acetoxy-α-ionol、acetoxy-β-ionol へと誘導化を行い、chiral GC によりその第 2 級アルコールの立体配置ならびに光学純度を決定したところ、α-ionol では 50%e.e 程度の(*S*)-体であり、β-ionol については 80% e.e 程度の(*S*)-体であることが分かった。

asymmetric oxidation, biocatalyst, aroma compounds

講演番号：4A03a06
講演日時：3 月 20 日 10:35～ A 校舎 03 会場

ダイズ加工時に 1-Octen-3-ol は配糖体加水分解で生成される
1-Octen-3-ol is formed by hydrolysis of its glycosides during processing soybean meals
○松井 健二[1]、肥塚 崇男[1]、竹本 裕之[2]、大西 利幸[3] ([1]山口大院創成科学、[2]静岡大グリーン研、[3]静岡大農)
○Kenji Matsui[1], Takao Koeduka[1], Hiroyuki Takemoto[2], Toshiyuki Ohnishi[3] ([1]Yamaguchi Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Shizuoka Univ.)

1-オクテン-3-オールは別名マツタケオールとも呼ばれ、キノコ類や菌類に特徴的な土臭さの原因化合物である。1-オクテン-3-オールは菌類だけでなくダイズを始めいくつかの豆類でも生成され、多くの場合、豆類加工時のオフフレーバーと見なされている。1-オクテン-3-オールはリノール酸への酸素添加によるリノール酸 10-ヒドロペルオキシドの生成と引き続く光学特異的開裂反応により生成されると考えられているがその生合成経路の実体は明らかになっていない。

ダイズはその食品機能性から近年注目されているが、ダイズ種子加工時に脂肪酸酸化を伴う代謝経路が活性化され、ヘキサナールなどのオフフレーバー化合物が生成されるためその用途が限定されている。1-オクテン-3-オールもダイズ加工時に生成蓄積するオフフレーバー化合物で、ヘキサナールなどと同様にリノール酸などの脂肪酸酸化反応によって生成すると考えられてきた。我々はダイズ種子 1-オクテン-3-オール生合成経路の解明を目的に、ダイズ加工処理により 1-オクテン-3-オールが生成される過程について検討したところ、1-オクテン-3-オールはリノール酸からの de novo 合成ではなく、乾燥ダイズ子実に 1-オクテン-3-オール配糖体が蓄積しており、それが加工時にグリコシダーゼにより加水分解されて生成されていることを見いだした。

乾燥ダイズ子実粉末を水に懸濁するとヘキサナール、1-オクテン-3-オールが直ちに生成され、懸濁後 30-60 分程度まで生成が持続した。脂肪酸からのこれらフレーバー化合物の *de novo* 生成には酸素が必須だが、嫌気下で懸濁した際にはヘキサナールの生成が抑えられたものの、1-オクテン-3-オールの生成は影響を受けなかった。このため、1-オクテン-3-オールは *de novo* 生成されているのではなく何らかの形で乾燥ダイズ子実中に貯蔵されているものと考えられた。マメ科シロツメクサ葉表面の分泌性葉毛は 1-オクテン-3-オールの二糖配糖体が主要な成分であることが知られている。そこで、ダイズ子実から配糖体画分を抽出し、アーモンド由来グリコシダーゼによる加水分解を施したところ、1-オクテン-3-オールの生成が認められた。これまでの予備的解析ではダイズ子実中には 1-オクテン-3-オールのヘキソース-ペントース二糖配糖体が蓄積していることが予想されており、乾燥ダイズ子実を水と破砕することで内在性グリコシダーゼが活性化し、蓄積されている 1-オクテン-3-オール配糖体を加水分解し、揮発性 1-オクテン-3-オールが生成し、オフフレーバーとなっていることが示唆された。現在、1-オクテン-3-オール配糖体を精製し、構造決定を進めている。

soybean, 1-octen-3-ol, glycoside

発表責任者：松井健二（matsui@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：4A03a07
講演日時：3 月 20 日 11:00～ A 校舎 03 会場

# レモン系低アルコール果汁飲料への果汁感付与に関わる香気成分の探索

A search of flavor components contributing to the juicy taste of the lemon flavor alcoholic drink

○瀬川 睦、水谷 浩平、鈴木 たまみ、和田 華奈子、西塚 太一 (アサヒビール)
○ Mutsumi SEGAWA, Kouhei MIZUTANI, Tamami SUZUKI, Kanako WADA, Taichi NISHIDUKA (Asahi breweries, LTD)

【背景および目的】

レモンの香気成分である citral は、飲料に使用することでレモン香を付与することが出来る。しかし citral は、加熱、光、酸性物質、酸素等の外的要因や、飲料の保存、搬送、陳列等による経時的要因により化学構造が変化し、結果 *p*-cresol (薬品様) 、*p*-cymene (灯油様)、*p*-methylacetophenone (杏仁豆腐様) といった劣化臭物質に変化する。このように飲料中の citral は不安定であるため、果汁感を維持するためにはこれを補完する他の要素が必要である。

レモン系低アルコール果汁飲料に柑橘由来オイル原料を多量使用することで高い果汁感を付与出来るが、果汁感への寄与が大きい香気成分については分からない点も多かった。本研究では、レモン系低アルコール果汁飲料において果汁感に寄与する香気成分を探索することを目的とした。

【方法】

柑橘由来オイル原料を中心に高い果汁感を狙って香味設計したサンプルと、市場に流通しているレモン系低アルコール果汁飲料 6 サンプルについて、予め提示した官能評価用語の有無を評価する CATA (check-all-that-apply) 官能を行った。また同サンプルの香気成分を GC/MS によりスキャン分析し、Mass Profiler Professional (Agilent Technologies 社) ソフトウェアを用いて主成分分析を行った。さらにモデル溶液に主成分分析で同定された香気成分を添加し、官能評価にて果汁感を評価した。

【結果】

高い果汁感を狙って香味設計したサンプルは他サンプルと比較して、CATA 官能によりグリーンな香気が特徴的であることが示唆された。さらに主成分分析の結果からも citral (レモン様) と methylheptenone (グリーン様) が特徴香であることが示された。

次に、モデル溶液中に citral および methylheptenone を併用して添加した際のレモンの果汁感を評価した。その結果、citral および methylheptenone の添加量増加に伴い果汁感が向上する効果が見られた。この methylheptenone を pH3.3 のモデル溶液に添加して 37℃で 1 週間保存したところ、80%以上が分解されず保存されていることを確認した。

【考察】

レモン系果汁飲料において citral は不安定な香気成分であるが、今回同定した methylheptenone は安定性が高く、これらを併用することでレモン果汁感の付与および維持が可能になると考えられる。

citral, methylheptenone, Check-all-that-apply (CATA)

発表責任者：瀬川睦（mutsumi.segawa@asahibeer.co.jp）

講演番号：4A03a08
講演日時：3 月 20 日 11:15～ A 校舎 03 会場

# 無合成農薬リンゴにおける香気プロファイルの経年変化および品種間差異

# Characteristics in flavor profiles of synthetic agrochemical-free apples: the effects of period after break and cultivars

○田中 福代[1]、立木 美保[2]、岡崎 圭毅[1]、伊藤 伝[2]（[1]農研機構 中央農研、[2]農研機構 果樹茶部門）
○Fukuyo TANAKA[1], Miho Tatsuki[2], Keiki Okazaki[1], Tsutae Ito[2] ([1]Central Region Agricultural Research Center, NARO, [2]Institute of Fruit Tree and Tea Science, NARO)

リンゴにおいて，栽培管理が風味関連成分に及ぼす影響を解析している．これまでに，‘ふじ’について合成農薬不使用栽培における 1)果実の香味特性のスイート・フローラル感の低下とグリーン感の強調，2)エステル類の減少，3)成熟期のエチレン生成量の低下を報告した。また，合成農薬中止後の経過年数が上記の現象を緩和する可能性が示唆された．そこで，試験栽培により上記効果における**品種間差異**と**有機栽培の継続年数**の関連を解析した．

**【方法】**

**試料：**農研機構果樹茶業部門（盛岡）において，早生種‘さんさ’，晩生種‘ふじ’を用いて 2013 年に実施した．一筆の慣行栽培園において，慣行防除区，合成農薬中止区（2009，2013 年から，代替農薬使用）を設定した．それぞれ処理区名を慣行，有機 5，有機 1（‘ふじ’のみ）とし，経時的に各 2 樹から 10 果を供試した．また，‘ふじ’については収穫後 1 週間のエチレン（50ppm）通気処理を行った．**分析：**収穫適期とその 10 日前に収穫した果実を対象に，香気プロファイルは果汁液(20%NaCl 添加)のヘッドスペースガスを捕集剤(MonoTrap，RGPS-TD)に吸着し，加熱脱着により GC/MS に導入し，DB-WAX カラムを用いて分析した．香気と同一試料について，エチレン生成に関与する *MdACS3* 等の遺伝子発現を解析した．また，常法によりエチレン発生量および品質関連調査を行った．

**【結果と考察】**

**エチレン発生量：**‘ふじ’では，収穫時のエチレン発生量は慣行>有機 5>有機 1 の順に多く，各水準に有意差が認められた．一方‘さんさ‘では有機区で少なかったが有意差は認められなかった．*MdACS3* の発現は両品種ともにエチレン発生量と同様の傾向を示した．

**香気成分プロファイルの特性：**‘ふじ’の有機区と慣行区は異なるクラスタに分類され，エステル類の低下が顕著であった．一方，‘さんさ’では有機・慣行に明瞭な差は認められず，この結果はエチレンの挙動とも一致するものであった．また，‘ふじ’はエステル比率が高いためエチレンの影響を受けやすいのに対し，‘さんさ’はアルコール比率が高く，影響を受けにくい品種であることも一要因と推定した．

**エチレン通気実験：**有機‘ふじ’はエチレン通気処理によりエステル類を中心に香気成分が顕著に増加し，香気成分の減少がエチレンの抑制によるものであったことが示唆された．一方で，慣行‘ふじ’ではエチルエステル類の比率が高かったが，有機‘ふじ’ではエチルエステルは検出されず，プロパノール以上のエステル類で構成された．これは，慣行はみつ入りであったのに対し，有機ではみつがなかったことによるものと考えられる．

以上から，無合成農薬栽培がリンゴの香気プロファイルに及ぼす効果は，エチレン発生量で説明できた．無合成農薬栽培に対するエチレン応答の品種間差の要因は今後の検討が必要である．

synthetic agrochemical-free apple, flavor profile, ethylene

発表責任者：田中福代（fukuyot@affrc.go.jp）

講演番号：4A03a09
講演日時：3 月 20 日 11:30～ A 校舎 03 会場

# バニラ香およびオレンジ香による塩味増強

# Salty taste enhancement by flavor of vanilla and orange.

○河合 崇行[1]、日下部 裕子[1]、後藤 猛仁[2] ([1]農研機構　食品研究部門、[2]山形県　工技セ)
○Takayuki KAWAI[1], Yuko KUSAKABE[1], Takehito GOTO[2] ([1]NFRI, NARO, [2]Yamagata Pref.)

日本ではしょうゆの香りが、ヨーロッパではイワシやベーコンなどの香りが塩味増強効果を持つと報告されている。しかし、フランス人を対象に行った実験では、醤油の香りに若干の塩味を感じるものの、口に含んだ際の塩味は、イワシやベーコンなどに比べて非常に弱く評価されていた。香りによる塩味想起や塩味感覚の強弱には、食経験が影響する可能性が考えられた。そこで、ヒトが塩味を想起しにくいと考えられるバニラとオレンジの香りを使い、これらの香りを塩味と結び付き学習することができるか否か、これらの香りを使って塩味増強を引き起こさせることができるか否かを、動物行動学実験により検討した。

6 週齢の c57BL/6 系統マウスを 2 群に分け、一方にバニラ香料を添加した食塩水を、他方にオレンジ香料を添加した食塩水を 3 週間提示して飼育した。同時に、前者にはオレンジ香料を添加した砂糖水を、後者にはバニラ香料を添加した砂糖水を提示した。その後、食塩水の提示を辞め、利尿薬スピロノラクトンを混ぜた餌で 3 週間飼育することで、塩味欲求性の高い状態にした。0, 15, 30, 45, 60 mM の食塩水と、バニラ香料あるいはオレンジ香料を添加した 30 mM の食塩水を準備して、10 秒間のリック試験に供した。マウスは食塩水との結び付けを試みたバニラ、オレンジの香りを付けた食塩水を、添加していない食塩水より多くリックしていた。しかし、砂糖水との結び付けを試みた香りを付けた食塩水に対しては、リックの増加は認められなかった。これらの結果は、香りを塩味の結び付け学習が成立していることを示している。また、学習した香りによって塩味増強が起きていることも示唆している。0～60 mM 食塩水のリック数に基づいた塩味強度検量線から、バニラ、オレンジのいずれの香料の場合も、香料添加による塩味増強の大きさは 15 mM 食塩水相当の塩味であると算出された。

我々が、しょっぱい・甘い・酸っぱい・苦いと感じる香りも、過去に長期間、味との結び付き学習した香りである可能性が高い。

salty taste, flavor, lick tests

講演番号：4A03a10
講演日時：3 月 20 日 11:45～ A 校舎 03 会場

# AROMATCH®を用いたバニラの香調プロファイリング

# Odor profiling of the vanilla using AROMATCH®

○末田 麗華、葛西 賢造、高垣 仁志（曽田香料株式会社）
○REIKA SUEDA, KENZO KASAI, HITOSHI TAKAGAKI (SODA AROMATIC Co.,Ltd.)

【緒言】

我々は匂いを嗅ぐ際、一つ一つの香気成分を嗅ぎ分けているのではなく、それらが組み合わさった複合臭の中で嗅いでおり、その中で香気の特徴を捉えている。食品の香気寄与成分の探索には GC を介した匂い嗅ぎ分析（以下、GC-O とする）が有効であり、近年では AEDA（Aroma Extract Dilution Analysis）等が一般的に用いられている。しかしながら、これらは単一成分の香気の評価方法であり、食品中の複雑な香気の中で一つ一つの成分がどのような香気的役割をしているかを評価するには、成分同士の相互作用という観点において限界があった。

そこで、我々は AROMATCH®評価法を開発し、様々な試料で検証を行っている。本評価法の特徴は、GC-O を行う雰囲気下に対象試料の香気を常に漂わせておくことである。すなわち、GC より分離してきた成分を複合臭の中で評価する。これにより、各香気成分が対象試料のどのような香調に寄与をしているのかといった、成分同士の相互作用を把握することができる。（図）

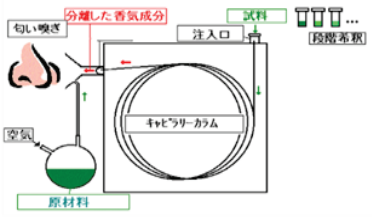


図 AROMATCH®装置図

【方法】

マダガスカル産バニラ豆を試料に薄膜蒸留により香気成分濃縮物を取得し、評価に用いた。

【結果】

１．香気寄与成分の探索

AROMATCH®により、バニラの香調にエンハンス効果を示す香気成分を絞り込んだ。単体ではグリーン様香気である成分が、バニラ香調の中ではラム酒を想起させることが判明した成分をはじめ、本評価ならではの知見も得られた。次に、エンハンス効果を示した成分をバルサム調、ハネー調といった香調ごとに振り分け、成分群とした。

２．成分群と香調プロファイルとの関連付け

成分群の再現香料にて香調の再現を確認した後、バニラ香気を構成する上で重要な香調プロファイルと関連付け、バニラ豆特有のバルサム感、スイート感、ラム酒感に寄与する香気成分を把握した。また、不明成分が存在した成分群については、GC 分取装置を用い有用性を確認するとともに、成分の同定に努めた。

aromatch, interaction, compound odor

発表責任者：高垣仁志（Hitoshi_Takagaki@soda.toray.co.jp）

講演番号：4A03a11
講演日時：3 月 20 日 12:00～ A 校舎 03 会場

# リアルタイム香気分析装置を利用した「喉越し感」に寄与する香りバランス変化に関する考察

# Real-time percept flavor balance derived from retronasal threshold and in vivo measurements of retronasal aroma release with PTR-MS

○伊藤 慎一郎、大森 憲、宮崎 秀基、武田 寿弘、星野 邦秀（高砂香料工業株式会社　研究開発本部）
○Shinichiro ITO, Ken OHMORI, Hideki MIYAZAKI, Toshihiro TAKEDA, Kunihide HOSHINO (Takasago International Corporation Corporate Research & Development Division)

【背景と目的】
飲食物を喫食する際に口腔内から鼻腔に入るレトロネーザルアロマ（口中香、喉越し香）は、鼻孔から入るオルトネーザルアロマ（鼻先香、たち香）とは区別され、特にレトロネーザルアロマは飲食物の「おいしさ」にとって鍵となると考えられている[1]。AEDA[2]は香りの貢献度を示す手法ではあるが、喫食時に感じている香りバランスを示してはいない。さらに、香りの時間変化を捉えることもできない。一方、リアルタイム計測機器を用いて鼻呼気中の香気成分をリアルタイムに計測する試みはあるが、香りバランスについて言及されている研究は殆んどない。そこで本研究では、飲料喫飲時の鼻呼気中の香気成分を陽子移動反応質量分析計（Proton Transfer Reaction-Mass Spectrometry；PTR-MS）でリアルタイム計測し、閾値と組み合わせることによって、鼻腔中のリアルタイムな香りバランスを予測する手法の開発を目的とした。
【実験と結果】
複数の香気成分を適量添加した飲料水を被験者が 10ml 喫飲し、PTR-MS を用いて鼻孔から放出される各香気成分をリアルタイムに計測後、呼吸ごとの各香気成分の放出濃度を算出した。香気成分の添加量と放出濃度はおおよそ比例関係にあることが確認されたため、成分を検出できない添加量の場合には、添加量に応じて呼吸ごとの放出濃度を推算することとした。また、各香気成分を添加した飲料水を飲んだ際の検知閾値を同被験者で評価し、閾値における鼻孔からの放出濃度を推算した。そして、閾値時の放出濃度と PTR-MS 計測に基づいた放出濃度の比率から、飲料喫飲時における各香気成分の貢献度を評価した。
続いて、2-Methylbutanal や 2,3-Dimethylpyrazine、Methyl cyclopentenolone などを含むモデルコーヒーフレーバーを用いて本手法を検証した。モデルフレーバーを賦香した飲料水を喫飲した場合の 1 呼吸目及び 10 呼吸目の各香気成分の貢献度を水への添加量に応じて算出し、それぞれの呼吸数の時の貢献度の割合から香りバランスを予測した。また、専門パネルが選定したコーヒーの香気を表現するワードを用いて、モデル飲料水を喫飲直後及び約 30 秒後の官能評価を行った。その結果、官能評価と香りバランスの予測は良好な関係性であった。従って、本研究の手法を用いることで、レトロネーザルアロマの感覚的な香りバランスを予測できるということが示唆された。
[1] Gordon M. Shepherd. (2013). *Neurogastronomy*　[2] *Trends in Food Sci. & Tech.* (1993), **4**, 68-73

retronasal, flavor, drink

講演番号：4A03a12
講演日時：3 月 20 日 12:15～ A 校舎 03 会場

# Temporal Dominance of Sensations (TDS) 法と機器分析を用いたグミ咀嚼中のレトロネーザルアロマリリースの評価

# Retronasal aroma release during consumption of gummy candies assessed by Temporal Dominance of Sensations (TDS) and GC/MS.

○大森 雄一郎、藤木 文乃、明賀 博樹、小林 恵美、前田 知子、中村 哲也、斉藤 司 (長谷川香料株式会社 総合研究所)
○Yuichiro OHMORI, Ayano FUJIKI, Hiroki MYOGA, Emi KOBAYASHI, Tomoko MAEDA, Tetsuya NAKAMURA, Tsukasa SAITO (T.Hasegawa Co.,Ltd.)

【目的】食品を食べた際に口腔内から鼻腔に抜ける香り、レトロネーザルアロマは、美味しさや嗜好性に影響を与えることから、食品や香料の開発においてレトロネーザルアロマの経時的なリリースを捉えることは重要である。とくに、官能評価と香気分析結果の関係を客観的に把握することができれば、製品開発の手掛かりとなる。そこで、時間経過に伴う複数の官能特性の評価が可能な官能評価手法 Temporal Dominance of Sensations 法 (以下 TDS)に着目し、グミ咀嚼中のレトロネーザルアロマに含まれる各種香気成分のリリースを機器分析で測定した結果と比較検証を行った。
【方法】試料は、同一のグレープ香料を同じ添加量で添加した硬さ違いのグミ(柔らかい、中程度、硬い)を用いランダム 3 桁番号を記載して提供した。評価者は、訓練を行い TDS の操作に慣れた社内の専門パネル 15 名(フレーバリストとフレーバーケミスト)で実施した。評価用語は、言葉だし、予備評価の結果をもとに、香りに焦点をあてた 5 用語(フルーティー、フローラル、グリーン、フォクシー、ゼラチン臭)を選定し、それぞれに対応する香気成分を標品に決定した。TDS の測定は、Biosystemes 製 FIZZ ソフトウェアを用い、試料を口に入れてすぐに評価を開始、咀嚼はメトロノームを用いて1秒1回のペースで 140 秒間評価した。機器分析は、咀嚼中の鼻からのレトロネーザルアロマを 30 秒間毎に吸着剤(Tenax TA チューブ)に捕集し、GC/MS に供することでグミ中の各種香気成分のエリア値を得た。
【結果および考察】TDS による評価では、柔らかいグミは、前半にフルーティー(ethyl propionate、ethyl butanoate 様)、中盤にフォクシー(methyl anthranilate 様)が有意に強く感じられた。中程度の硬さのグミは、前半のフルーティーの用語選択割合(dominance rate)が柔らかいグミに比べ低下した。硬いグミは前半にゼラチン臭、中盤にフルーティー、後半にフォクシーが有意に強く感じられた。また、TDS で有意に選択された用語「フルーティー」と「フォクシー」に着目し、TDS の評価用語の選択時間(duration time)の 30 秒間毎の合計値と、各用語特性に対応する香気成分「ethyl propionate、ethyl butanoate」と「methyl anthranilate」の 30 秒間毎の GC/MS エリア値を比較したところ、官能評価データと機器分析データそれぞれの値の増減の挙動に同様の傾向が伺えた。評価用語に香り以外の特性を含めず、TDS のボタン選択時間の合計値と香気分析結果を一定時間毎に分割して解析することで、その関連を比較できることができ、TDS と機器分析による評価は、食品や香料の開発・改良の手掛かりとなりうることが示唆された。

retronasal aroma, temporal dominance of sensations, flavor release

講演番号：4A04a01
講演日時：3 月 20 日 09:20～ A 校舎 04 会場

# 子宮内高血糖環境が胎児心筋細胞に与える影響

# The effect of intrauterine hyperglycemic environment on fetal cardiomyocytes

○中村 彰男[1]、野口 礼於奈[2]、河原田 律子[2]([1]群馬大　院医、[2]高健大　栄養)
○Akio NAKAMURA[1], Reona NOGUCHI[2], Ritsuko KAWAHARADA[2] ([1]Gunma Univ., [2]Takasaki Univ. of Health and Welf.)

胎児期の初期栄養がその後の肥満や糖尿病そして心血管病の発症に深く関わっている事が多くの研究により明らかになっている。糖尿病の母親から産まれた子供(Infants of diabetic mother；IDM)ではしばしば心血管系の異常が見られる。我々は胎児期に子宮内高血糖環境に曝された IDM の心血管系の異常を分子レベルで解明するために、糖尿病妊娠モデルラットから生まれた仔の心臓におけるシグナル伝達系についてこれまで研究を行ってきた。その結果、IDM の血糖値は生後４日目には正常値に戻るにもかかわらず、Akt に関連するインスリンシグナルは異常を示した。ところが、その異常は妊娠中に母親がエイコサペンタエン酸（EPA）を摂取する事により改善される事が明らかになった。しかしながら、IDM の心臓におけるシグナル異常がどの様なメカニズムで引き起こされるかに関しては良く解っていない。そこで、その分子機序を明らかにするために心筋タンパク質の糖化について検討を加えた。

糖尿病妊娠モデルラットは妊娠期間中、普通食を摂取させ、半数の母親には EPA を胃ゾンデにて毎日経口投与し、生まれた仔の心臓およびそれらの心臓から単離培養した初代心筋芽細胞においてタンパク質の Advanced Glycation End Products（AGEs）化について抗 AGEs 抗体を用いてウェスタンブロット法にて調べた。さらに、AGEs の受容体である Receptor of AGEs（*RAGE*）と炎症性サイトカインの遺伝子発現をリアルタイム PCR により測定した。

IDM の心臓およびそれらの心臓から単離培養した初代心筋芽細胞では多くのタンパク質が過度に AGEs 化されていた。さらに、タンパク質の AGEs 化に伴い *RAGE* の遺伝子発現も上昇していた。また、SAPK/Jun amino-terminal kinase（JNK）のリン酸化レベルを調べたところ、*RAGE* の遺伝子発現の上昇に伴い JNK のリン酸化レベルも亢進している事が明らかとなった。ところが、妊娠期間中に EPA を摂取した母親から生まれた IDM の心臓およびその初代心筋芽細胞ではタンパク質の過度な AGEs 化は見られず、それに伴う *RAGE* の遺伝子発現上昇や JNK の活性化も抑制されていた。

子宮内高血糖環境は胎児の心臓の過度な AGEs 化を引き起こし、その結果、*RAGE* の遺伝子発現が上昇し、JNK シグナル伝達系が惹起される可能性が示唆された。そして、JNK シグナル伝達系の亢進により、心筋の炎症が引き起こされているのではないかと考えられる。しかしながら、これらの障害が妊娠期の母親の EPA 摂取により改善されることが明らかとなった。

Infants of diabetic mother, eicosapentaenoic acid, cardiac cell

発表責任者：中村彰男（gacho@gunma-u.ac.jp）

講演番号：4A04a02
講演日時：3 月 20 日 09:35～ A 校舎 04 会場

# カカオポリフェノールによるエネルギー代謝促進効果：投与タイミングと時計遺伝子発現

# Promotion of energy metabolism by cacao polyphenols: administration timing and clock gene expression

○光橋 雄史、山下 陽子、芦田 均 (神戸大院農)
○Yuji MITSUHASHI, Yoko YAMASHITA, Hitoshi ASHIDA (Grad. Sch. of Kobe Univ.)

【目的】ポリフェノールなどの非栄養素は、第三次機能を持つ食品成分として注目されているが、その作用発揮と投与タイミングの関わりについては、ほとんど報告がない。本研究では、肥満や高血糖の抑制効果が報告されているカカオポリフェノール抽出物 (CLPr)を用い、実験動物への投与タイミングの違いが、時計遺伝子およびエネルギー代謝関連遺伝子に及ぼす影響を調べた。また、CLPr の投与タイミングの違いが、糖代謝や脂質代謝に与える影響についても調べた。
【方法】実験① 雄性 C57BL/6N マウスに CLPr あるいは水を 150 mg/kg body weight の濃度で、胃ゾンデにて強制経口投与した。投与するタイミングは、Zeitgeber Time (ZT) 3、ZT9、 ZT15、ならびに ZT21 に設定し、投与 3 時間後に摘出した組織における時計遺伝子、およびエネルギー代謝関連遺伝子発現の変化を測定した。実験② CLPr あるいは水を 50 または 150 mg/kg body weight の濃度で、雄性 ICR マウスに ZT1 または ZT9 に胃ゾンデにて経口投与し、その 1 時間後にグルコースを 1 g/kg body weight で経口投与した。グルコース投与後 0、0.25、0.5、1、ならびに 2 時間後の血液を尾静脈から経時的に採血し、血漿中のグルコース濃度を測定した。実験③ 雄性 C57BL/6N マウスに CLPr あるいは水を 1 または 10 mg/kg body weight の濃度で、胃ゾンデにて強制経口投与を 1 日 1 回、1 週間行った。投与するタイミングは、ZT 1 あるいは ZT9 に設定した。なお、餌は普通食または高脂肪食を自由摂食させた。7 日目の最終投与 1 時間後に屠殺し、体重、各脂肪重量、血糖値、GLP-1 分泌量、ならびに摘出した組織における時計遺伝子、およびエネルギー代謝関連遺伝子発現の変化を測定した
【結果】肝臓において、CLPr を ZT3 に投与した場合、*Per1*、*Per2*、*Per3*、ならびに *Dbp* の発現量は水群と比較して有意に増加し、*Pgc1 alpha* と *Ppar gamma* も増加傾向を示した。一方、*Bmal1* の発現量は有意に減少した。筋肉においても、CLPr を ZT3 に投与した場合に、*Per1*、*Per2*、*Per3*、ならびに *Dbp* の発現量は、水群と比較して有意に増加した。また、CLPr の血糖上昇抑制効果は、ZT1 投与で認められたが、ZT9 投与では効果がなかった。ZT1 に 1 週間投与したマウスでは、高脂肪食摂取による脂肪蓄積の抑制効果や GLP-1 分泌促進効果が認められたが、ZT9 投与ではこれらの効果は認められなかった。
【結論】CLPr は、その投与タイミングによって、肝臓と筋肉の時計遺伝子発現、ならびに血糖調節効果を変化させ、その効果は特に ZT1~3 (明期開始時)の投与において強いことが明らかになった。

Cacao polyphenol, Clock gene, Energy metabolism

発表責任者：光橋雄史（1176431a@gmail.com）

講演番号：4A04a03
講演日時：3 月 20 日 09:50～ A 校舎 04 会場

膵β細胞における *S*-エクオールの cAMP 産生作用には GPCR が関与する
Involvement of GPCR in *S*-equol-induced cAMP production in pancreatic β-cells
○堀内 寛子[1]、原田 直樹[1]、乾 博[2]、山地 亮一[1] ([1]大阪府大・生命環境、[2]大阪府大・栄養)
○Hiroko HORIUCHI[1], Naoki HARADA[1], Hiroshi INUI[2], Ryoichi YAMAJI[1] ([1]Div. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Div. Clin. Nutr., Osaka Pref. Univ.)

【背景・目的】インスリン分泌量は膵β細胞の量と個々のβ細胞のインスリン分泌能によって規定され、その減少は 2 型糖尿病の発症や進行の原因となる。cyclic AMP/protein kinase A（cAMP/PKA）シグナルの活性化は膵β細胞の量とインスリン分泌能を増加させる。我々は、大豆イソフラボンであるダイゼインから腸内細菌によって産生される *S*-エクオールが鏡像異性体選択的に β 細胞における cAMP/PKA シグナルを活性化し、cAMP 応答配列（CRE）を介した転写活性を上昇させることを見出している（*J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **60**, 291-296, 2014）。本研究では、ラット膵β細胞由来 INS-1 細胞を用いて、*S*-エクオールによる cAMP 産生機構について検討を行った。
【方法・結果】INS-1 細胞において、*S*-エクオールによる CRE を介した転写活性の上昇は、細胞膜に局在するアデニル酸シクラーゼ阻害剤（2′,5′-dideoxyadenosine）によって抑制されたが、サイトゾル局在型のアデニル酸シクラーゼ阻害剤（KH7）による影響はみられなかった。*S*-エクオール（10 μM）は細胞膜画分において cAMP の産生を促進したが、サイトゾル画分では促進しなかった。また、細胞膜画分において、10 μM の *S*-エクオールはホスホジエステラーゼの活性に影響を与えなかった。次に、細胞膜に局在するアデニル酸シクラーゼは三量体 G タンパク質の Gαs サブユニットによって活性化されるため、*S*-エクオールによる cAMP/PKA シグナル活性化への G タンパク質の関与を検討した。siRNA により Gαs サブユニットをノックダウンした結果、*S*-エクオールによる CRE を介した転写活性の上昇が抑制された。また、Gαs サブユニットの GTPase 活性を阻害することで恒常的に Gαs を活性化させるコレラ毒素は、*S*-エクオールと相乗的に CRE を介した転写活性を増加させた。一方、アデニル酸シクラーゼを直接活性化するフォルスコリンとコレラ毒素の作用は相加的であった。さらに、*S*-エクオールによる cAMP/PKA シグナルの活性化に G タンパク質共役受容体（GPCR）が関与しているかを検討した。GPCR キナーゼ（GRK）はリガンドが結合した GPCR をリン酸化することで GPCR のシグナルを抑制する。siRNA により GRK3 および 6 をノックダウンすると、*S*-エクオールによる CRE を介した転写活性がさらに上昇したが、GRK2 のノックダウンによる影響はみられなかった。一方で、GRK2、3、および 6 の高発現はすべて、*S*-エクオールによる CRE を介した転写活性を減弱させた。以上の結果から、*S*-エクオールは細胞膜に局在する GPCR の作用を介して cAMP を産生することで、膵β細胞の量とインスリン分泌能を増加させると考えられる。

equol, pancreatic β-cell, cAMP/PKA signaling

講演番号：4A04a04
講演日時：3 月 20 日 10:05～ A 校舎 04 会場

キャノロールの糖・脂質代謝改善作用及びそのメカニズムに関する研究
Effects of canolol on glucose and lipid metabolism in mice and its mechanism
○崔 楠[1]、蓮野 裕貴[1]、山室 美由紀[1]、高橋 麻子[1]、平井 静[1]、根崎 裕子[2]、山田 浩司[2]、弥武 経也[2]、河本 高伸[2]、江頭 祐嘉合[1]（[1]千葉大院・園芸・応生化、[2]昭和産業（株））
○Nan CUI[1], Yuki Hasuno[1], Miyuki Yamamuro[1], Asako Takahashi[1], shizuka Hirai[1], Yuko Nezaki[2], Kouji Yamada[2], Tsuneya Yatake[2], Takanobu Koumoto[2], Yukari Egashira[1] ([1]Chiba Univ., [2]Showa Sangyo Co. LTD.)

［背景］キャノロール（4-Vinyl-2,6-dimethoxyphenol）は、キャノーラ油（ナタネ油）から分離されたポリフェノールの一種である。キャノロールは強力な抗酸化作用を有し、アルカリペルオキシラジカルに対するスカベジング能はα-トコフェロール、β-カロテン、ビタミン C、ルテインよりも高いことが報告されている。また、炎症性サイトカイン産生の抑制による抗がん作用及び抗炎症効果も報告されている。しかし、キャノロールが糖・脂質代謝に及ぼす影響についてはまだ報告されていない。そこで本実験では、*in vitro* また *in vivo* においてキャノロールがマウスの糖・脂質代謝に及ぼす影響およびそのメカニズムについて検討した。
［方法］実験１）アフリカミドリザル腎臓由来 CV-1 細胞を用い、培養液にキャノロールを添加し、PPARγ レポーターアッセイを行った。キャノロールを添加した培地で 3T3-L1 前駆脂肪細胞を分化誘導した後、Oil Red O 染色および遺伝子発現量の測定を行い、キャノロール脂肪細胞分化に及ぼす影響を検討した。実験２）C57BL/6 雄マウスを 16 匹購入し、1 週間の予備飼育を行った。その後、高脂肪食にキャノロールを 1.0 %（1.0%can、n=8）添加した群、また 1.0%can 群の摂食量に合わせて高脂肪食を与えるペアーフェッド群（HFD、n=8）に群分けを行った。16 週間後に解剖を行い、臓器重量、血漿パラメーター、肝臓脂質成分、肝臓脂質代謝関連遺伝子の発現を測定した。
実験3）二型糖尿病モデルマウスである KK-Ay/TaJcl5 にキャノロール含量の異なる高脂肪食を摂取させ、4 週間飼育を行った。
［結果］実験１）CV-1 細胞において、キャノロールは濃度依存的に PPARγ レポーター活性を上昇させた。また、3T3-L1 細胞において、キャノロールは脂肪細胞分化を促進する傾向が示唆された。
実験２）HFD 群と比較して 1.0%can 群で臓器重量及び血漿中脂質成分の有意な差は見られなかった。HFD 群と比較して 1.0%can 群で肝臓中中性脂肪は有意に減少し、LXR　mRNA 及び FAS mRNA 発現量は減少傾向を示した。以上の結果より、キャノロールには脂質代謝改善作用が認められ、そのメカニズムの一部に脂肪酸合成系遺伝子発現の減少が関与する可能性が示唆された。
実験３）キャノロールは血中グルコース値を有意に低下させた。また、血中アディポネクチン値、及び白色脂肪組織での PPARγ や GLUT 4 など糖代謝関連遺伝子の発現量をキャノロールは濃度依存的に上昇させた。以上の結果から、キャノロールは PPARγ の活性化により糖代謝を改善させた可能性が示唆された。

canolol, glucose metabolism, lipid metabolism

発表責任者：江頭　祐嘉合（egashira@faculty.chiba-u.jp）

講演番号：4A04a05
講演日時：3 月 20 日 10:20～ A 校舎 04 会場

# 糖尿病モデルマウスにおけるイチゴポリフェノールの抗糖尿病作用

# Anti-diabetic effect of strawberry polyphenol in type 2 diabetic model mice

○近藤 真司[1]、安達 真一[1]、吉澤 史昭[2,3]、矢ヶ崎 一三[1] ([1]宇都宮大・バイオセ、[2]宇都宮大・農、[3]農工大院・連農)
○ Shinji KONDO[1], Shin-ichi ADACHI[1], Fumiaki YOSHIZAWA[2,3], Kazumi YAGASAKI[1] ([1]Utsunomiya Univ. C-Bio, [2]Utsunomiya Univ., [3]Tokyo Univ. of Agri. and Tech.)

【目的】

生活習慣病に位置づけられる２型糖尿病は、世界的に増加しつつある。２型糖尿病はインスリン抵抗性が発症の一要因とされ、血糖値が低下しないなど血糖コントロールの機能不全により惹起される。機能不全が続くと、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症などを合併し、生活の質を著しく低下させる。本研究では、イチゴに含まれるポリフェノールの一つであるタキシフォリンに着目し、２型糖尿病モデルマウスを用いてその抗糖尿病作用の解析を目的とする。

【方法】

２型糖尿病に対するタキシフォリンの作用を検討するため、２型糖尿病モデル KK-A$^{y}$ マウスを用いた。糖尿病モデルマウスに毎日タキシフォリンを４週間経口投与した。毎週、尾静脈より採血し、血糖値を測定した。４週投与期間終了後、マウスから血液、肝臓、筋肉等の組織を採取した。血漿のグルコース濃度とインスリン濃度を測定し、インスリン抵抗性の指標である HOMA-IR を算出した。血漿中の脂質（コレステロール、トリグリセリド）、アディポサイトカインおよび尿酸濃度を測定した。これらの値を正常マウスと比較した。

【結果と考察】

正常マウスに比べ、糖尿病モデルマウスにおいて、血漿中のグルコース濃度、インスリン濃度、HOMA-IR、脂質および尿酸濃度は有意に上昇した。これらの上昇に対し、タキシフォリン経口投与により、糖尿病群対照群に比べ血漿のグルコース濃度、インスリン濃度、HOMA-IR および尿酸濃度が有意に低下またはその傾向を示した。また、尿酸濃度とインスリン抵抗性の間に正相関性のあることを既に見出しているが、タキシフォリンにより改善されることも示唆された。これらの結果から、タキシフォリンに抗糖尿病作用があることが強く示唆された。

strawberry, polyphenol, diabetes

講演番号：4A04a06
講演日時：3 月 20 日 10:35～ A 校舎 04 会場

PPARalpha アゴニストは FGF21 の脂肪組織に対する作用の亢進を介して糖質代謝異常を改善する
FGF21 Plays an Important Role in PPARalpha Agonist-induced Amelioration of Glucose Metabolism Abnormalities in Obese Mice.

○後藤 剛[1,2]、平田 茉莉子[1]、青木 ゆめこ[1]、高橋 春弥[1]、Kim Minji[1]、Jheng Huei-Fen[1]、野村 亘[1,2]、高橋 信之[1,2]、河田 照雄[1,2] ([1]京大院農・食品生物、[2]京大・生理化学研究ユニット)
○Tsuyoshi Goto[1,2], Mariko Hirata[1], Yumeko Aoki[1], Haruya Takahashi[1], Minji Kim[1], Huei-Fen Jheng[1], Wataru Nomura[1,2], Nobuyuki Takahashi[1,2], Teruo Kawada[1,2] ([1]Grd. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Res. Unit Physiol. Chem., Kyoto Univ.)

【背景・目的】　リガンド要求性の核内受容体型転写因子 PPARα は肝臓等において、脂肪酸酸化過程の遺伝子発現を制御している。PPARα リガンドはフィブラート系脂質代謝改善剤に加え、種々の脂肪酸など食品成分中にも存在し、その摂取は脂質代謝を亢進させることで高中性脂肪血症を改善することがよく知られている。高中性脂肪血症に加え、PPARα アゴニスト摂取時には、肥満に伴う糖質代謝異常が改善することがげっ歯類において報告されており、ヒトにおいても同様の報告が散見される。しかしながら、PPARα アゴニスト摂取時の糖質代謝異常症の改善機構については不明な点が多い。本研究では、PPARα アゴニスト摂取時の糖質代謝異常症改善機構について明らかにすることを目的とし検討を行った。
【方法・結果】　C57BL/6 マウスに対し、高脂肪食負荷すると同時に合成 PPARα アゴニストであるフェノフィブラート(Feno)投与を行ったところ、Feno 投与は高脂肪食による肥満の進展を有意に抑制し、高インスリン血症を改善した。また、高脂肪食負荷により肥満させた C57BL/6 マウスに対し、Feno を投与すると、摂食量には差がないにも関わらず、体重・体脂肪量を低下させ、さらに、耐糖能異常やインスリン抵抗性の改善が示唆された。次に、Feno 投与による糖質代謝異常症の改善効果が脂肪組織によるものであるか検討するため、Feno を脂肪萎縮性糖尿病モデルマウスである、A-ZIP/F-1 マウスに投与した。A-ZIP/F-1 マウスに対する Feno 投与は、肝臓における PPARα の主要な標的遺伝子群の発現を誘導し、高中性脂肪血症を改善したにも関わらず、耐糖能異常や高血糖に対して有用性を示さなかった。これより、Feno 投与による糖質代謝異常症の改善効果には脂肪組織の作用が重要であることが示唆された。そこで、PPARα 活性化時に肝臓より分泌され、脂肪組織に作用するホルモンである FGF21 の抗肥満作用に着目し、検討を行った。Feno を投与した野生型マウスでは、白色脂肪組織において熱産生に関与する遺伝子群の発現が上昇し、白色脂肪組織の褐色化が示唆された一方で、FGF21 欠損マウスに対する Feno 投与では、白色脂肪組織の褐色化は認められなかった。高脂肪食摂取により肥満を誘導した FGF21 欠損マウスでは、高中性脂肪血症の改善作用は認められたものの、野生型マウスで認められた、Feno 投与による体重低下や耐糖能異常・インスリン抵抗性の改善、白色脂肪組織の褐色化といった表現型が消失または減弱することが明らかとなった。
【結論】　PPARα アゴニストは FGF21 の白色脂肪組織に対する作用を亢進させ、肥満に伴う糖質代謝異常を改善する。

PPARα, FGF21, obesity

講演番号：4A04a07
講演日時：3 月 20 日 11:00～ A 校舎 04 会場

# アミロマルターゼとブランチングエンザイムを利用した緩やかな消化性と高い消化性の両方の特徴を持つ高分子デキストリンの合成

# The design of a slowly and highly digestible dextrin by the combinatorial use of amylomaltase and branching enzyme

○渡邊 浩史、寺田 喜信、柳瀬 美千代、鷹羽 武史、栗木 隆 (江崎グリコ株式会社)
○Hiroshi WATANABE, Yoshinobu TERADA, Michiyo YANASE, Takeshi TAKAHA, Takashi KURIKI (EZAKI GLICO CO.,LTD.)

【目的】糖質は身体の主要なエネルギー源である。しかしながら、糖質消化に伴う急激な血糖値上昇（血糖スパイク）やインスリンスパイクは重大な健康リスクの増大につながる。そのため、緩やかな消化性を持つ糖質が求められている。緩やかな消化性をもつ糖質には、例えばβ-リミットデキストリンなど難消化性デキストリンが知られている。しかしながら、難消化性デキストリンは難消化性成分を含むため、エネルギー源として適さないという問題がある。そこで本研究では、高い水溶性、緩やかな消化性、低い難消化性成分という特徴を持つ新しい高分子デキストリンを合成することを目標とした。
【方法】ワキシーコーンスターチを基質にブランチングエンザイム(BE; 1,4-α-glucan branching enzyme; EC 2.4.1.18; GH13)とアミロマルターゼ (AM; 4-α-glucanotransferase; EC 2.4.1.25; GH77)を同時に酵素反応させる方法により、目的の水溶性高分子デキストリン (BEAM-HBD) を合成した。BEAM-HBD の分岐頻度、単位鎖長分布などの構造的特徴、in vitro 消化性、ヒトにおける経口摂取時の血糖値およびインスリン値の変化を調べた。
【結果】in vitro 消化性試験の結果、合成した BEAM-HBD は初期消化速度が遅く、難消化性成分をほとんど含まない糖質であることが分かった。BEAM-HBD の単位鎖長を分析したところ、なだらかな鎖長分布を持ち、一般的なデキストリンやβ－リミットデキストリンとは鎖長分布の異なるユニークな分子構造と消化性を持つ、新しいタイプの高分子デキストリンであることが示唆された。 一方で BEAM-HBD の消化性はα-1,6 結合の分岐頻度とあまり相関しないことが分かった。このことから、α-1,6 結合の含量以外に、単位鎖長分布の特長に由来するグルカンの高次構造の違いが、消化性に関係していると考えられた。
BEAM-HBD を経口摂取したときの血糖値およびインスリン値の変化についてヒトを対象に実施した。その結果、BEAM-HBD 摂取後の血糖値はグルコース摂取と比較して 10 分と 20 分で有意に低値を示したが、一方で AUC に有意差は見られなかった。インスリン値は、10、20、30、90 分と AUC で有意に低値を示した。このように、BEAM-HBD は初期血糖値の上昇が緩やかで、インスリンの分泌を刺激しにくいことが示唆され、新規な糖質エネルギー源としての利用が期待される。
また、AM を他の酵素と組み合わせて使用するという方法は、糖質の構造をデザインする上で大変有効であることがあらためて示された。

slowly digestible dextrin, amylomaltase, branching enzyme

発表責任者：渡邊浩史（watanabe-hiroshi@glico.co.jp）

講演番号：4A04a08
講演日時：3 月 20 日 11:15～ A 校舎 04 会場

アーモンドの血糖値上昇抑制効果
The effects of almond (*Prunus dulcis*) on the postprandial blood glucose levels in mice
○加藤 和子、Vo Phuong、古屋敷 隆、釜阪 寛、栗木 隆（江崎グリコ（株）健康科学研究所）
○Kazuko Kato, Phuong Vo, Takashi Furuyashiki, Hiroshi Kamasaka, Takashi Kuriki (Institute of Health Sciences, Ezaki Glico Co., Ltd., Osaka, Japan)

【目的】アーモンドは食物繊維やポリフェノールを豊富に含み、健康の維持増進に有効な食べ物であると考えられている。近年、アーモンドをパンや米飯と同時に摂取することで、食後の血糖値上昇を抑制することが報告された。しかし、アーモンドの本効果に関して、その詳細は明らかになっていない。本研究では、アーモンド中の有効成分を探索し、メカニズムを検証することで、アーモンドの血糖値上昇抑制効果を詳細に検討した。
【方法】雄性 ICR マウスを一晩絶食させた後、試験食を糖質と同時に経口投与した。投与前、投与後 15、30、45、60、90、120 分に尾静脈採血により血液を回収し、血漿中のグルコースとインスリン量を市販の測定キットを用いて測定した。試験食は、皮つきおよび皮なしアーモンドペースト（4 g/kg 体重）、あるいは、アーモンドペーストから分画した、アーモンドオイル、水溶性画分、不溶性画分をアーモンドペーストと等しくなるように水で希釈して投与した。陽性対照として難消化性デキストリンを 0.4 g/kg 体重で投与し、陰性対照として水を投与した。アーモンドオイルの比較対照として、ピーナッツオイル、くるみオイル、オリーブオイルを用い、体重あたりの投与量がアーモンドオイルと等しくなるよう、各オイルを投与した。糖質は、10%デキストリン水溶液を用い、1 g/kg 体重で経口投与した。
【結果】アーモンドペーストを糖質と同時に投与することで、陰性対照群と比較し、血糖値の上昇が有意に抑制された。インスリン値を測定したところ、アーモンドペースト投与群で有意に高値を示したことから、アーモンドペーストの血糖値上昇抑制効果にはインスリン分泌促進が関係していると考えられた。有効成分の探索を目的として、皮つきペーストと皮なしペーストを比較したところ、どちらを投与した場合も、血糖値の上昇は抑制された。そのため、皮の成分は本効果に関係ないと考えた。次に、各分画成分を糖質と同時に投与した結果、アーモンドオイルにのみ血糖値上昇抑制効果が認められた。一方で、アーモンドオイルにはインスリンの分泌を促進する効果はなく、インスリン非依存的に血糖値上昇を抑制していると考えられた。くるみオイル、オリーブオイルにも、有意な血糖値上昇抑制効果が認められたが、ピーナッツオイルには効果は認められなかった。以上の結果より、アーモンドペーストおよびアーモンドオイルの血糖値上昇抑制効果が確認された。アーモンドオイルの効果は、オイルの物性だけでなく、オイルを構成する脂肪酸組成にも起因する可能性が示唆された。

almond (*Prunus dulcis*), postprandial blood glucose level, insulin

発表責任者：加藤　和子（kato-kazuko@glico.co.jp）

講演番号：4A04a09
講演日時：3 月 20 日 11:30～ A 校舎 04 会場

# シナモン熱水抽出物はインスリンシグナルを介してグルコース取り込みを促進する

# Cinnamon extract stimulates glucose uptake through the activation of insulin signaling

○チン セイセン[1]、青田 彩花[2]、島村 真保子[2]、増澤(尾﨑) 依[1,2]、細野 崇[1,2]、松藤 寛[3]、関 泰一郎[1,2] ([1]日大院・生資科・応生科、[2]日大・生資科・生命化、[3]日大・生資科・食生)
○Jingxuan CHEN[1], Ayaka AOTA[2], Mahoko SHIMAMURA[2], Yori OZAKI-MASUZAWA[1,2], Takashi HOSONO[1,2], Hiroshi MATSUFUJI[3], Taiichiro SEKI[1,2] ([1]Nihon University, Graduate School of Bioresource Sciences, Department of Applied Life Sciences, [2]Nihon University, College of Bioresource Sciences, Department of Chemistry and Life Science, [3]Nihon University, College of Bioresource Sciences, Department of Food Bioscience and Biotechnology)

【目的】近年、生活習慣を原因とする 2 型糖尿病の増加が著しく、その予防と改善法の確立が急務となっている。中国などで古くから漢方薬として用いられてきたシナモンは、抗アレルギー作用、抗炎症作用、中枢抑制作用、抗血栓作用を持つことが知られている。これまでに演者らは、シナモン熱水抽出物(CE)が培養脂肪細胞および筋管細胞において、LKB1-AMPK 経路を介してグルコース輸送担体 GLUT4 の細胞膜への移行を促進し、グルコースの取り込みを増加させること、また、インスリン非依存的に血糖値を低下させることを *in vivo* で明らかにした。本研究では、CE のグルコース取り込み促進作用がインスリン受容体の活性化を介しているか、さらに、CE に含まれる活性化合物の同定を目的とした。
【方法】CE がインスリンシグナルを介してグルコース取り込みを促進するかを明らかにするため、マウス胎児繊維芽細胞株 3T3-L1 を脂肪細胞に分化させた後、$^{3}$H を標識した 2-デオキシグルコースの取り込み実験を行った。さらに、インスリン受容体キナーゼ阻害剤の AG1024 および PI3 キナーゼ阻害剤の LY294002 を用いて、GLUT4 の膜移行に関わる Akt のリン酸化レベルについて Western blotting によって検討した。また、CE に含まれる活性化合物を同定するため、ヘキサン、酢酸エチル、1-ブタノールを用いた液々分配を行った。得られた各画分(ヘキサン画分、酢酸エチル画分、1-ブタノール画分、水画分)がグルコースの取り込みに及ぼす影響を検討した。また、活性化合物の分子量を調べるため、限外濾過膜を用いて分画を行い、各画分がグルコースの取り込みに及ぼす影響を検討した。
【結果】3T3-L1 脂肪細胞において、CE は Akt のリン酸化レベルを増加させ、グルコースの取り込みを促進した。さらに CE による Akt のリン酸化およびグルコース取り込みは、AG1024 と LY294002 処理により阻害された。液々分配で得られた画分については、水相画分と 1-ブタノール画分がグルコース取り込みを促進した。これらの画分に含まれる高分子量の化合物がグルコースの取り込みを促進した。
【結論】CE はインスリンシグナルを活性化することでグルコース取り込みを促進した。また、その活性成分は高分子量の水溶性化合物であると推定された。

Cinnamon, Insulin signaling, Diabetes

講演番号：4A04a10
講演日時：3 月 20 日 11:45～ A 校舎 04 会場

# 骨格筋において糖取り込みを促進させる EGCg の標的分子探索

# Search for target molecule of EGCg to promote glucose uptake in skeletal muscle

○池田 真規、芦田 均 (神大農)
○Masaki Ikeda, Hitoshi Asida (Kobe Univ.)

【目的】茶カテキンである(−)−Epigallocatechin−3−gallate(EGCg)は、糖輸送担体 4 型(GLUT4)の細胞膜移行を介した高血糖予防効果をもつことが報告されている。当研究室では、これまでに、ラット骨格筋由来L6 筋管細胞(L6 細胞)においてEGCg によるGLUT4 の細胞膜移行には、インスリンシグナル伝達経路のうち、PI3K より下流のシグナルが関与することを明らかにしてきた。しかし、上流の作用機構、特に標的分子は不明である。そこで本研究は、レドックスサイクリング染色法を用いて、L6 細胞におけるGLUT4 の細胞膜移行を促進させるEGCg の標的分子の探索を試みた。
【方法】EGCg とタンパク質との結合ならびに結合の強弱を評価するために、酸化還元反応を利用したレドックスサイクリング染色法を用いた。まず、レドックスサイクリングの染色条件と脱色条件についてカテキン標的分子のモデルタンパク質として知られる、ウシ血清アルブミン（BSA）を用いて検討した。次に、L6 細胞（in vitro）ならびにラットより摘出した骨格筋組織（in vivo）を用いて全タンパク質画分、細胞膜画分、細胞質画分に分画した後、EGCg（5μM−500μM）を 15 分間作用させ、電気泳動を行った後に、レドックスサイクリング染色を行った。染色された位置のバンドをゲルから切り出し、タンパク質をトリプシン消化し、質量分析計(LC−MS/MS）に供することで、MASCOT 解析を行い標的候補分子の同定を試みた。
【結果】染色条件を検討したところ、用事調整した染色液を用い、遮光、室温で 45 分間静置することにより最適な染色条件が得られた。また、塩酸、過酸化水素水、グリシンを用いて脱色するとバックグラウンドが低くなり、染色バンドが明確になった。*In vitro* ならびに *in vivo* で筋肉の全タンパク質画分、細胞膜画分、細胞質画分にEGCg を作用させ、電気泳動した後にレドックスサイクリング染色を行ったところ、6 か所のバンドが確認された。MASCOT 解析に供したところ 797 のタンパク質が検出され、40KDa 付近において、標的候補分子として、膜タンパク質 Adhesion G protein−coupled receptor L2 と膜関連タンパク質 Serine−threonine kinase receptor−associated protein を見出した。
【結論】膜タンパク質 Adhesion G protein−coupled receptor L2 と膜関連タンパク質 Serine−threonine kinase receptor−associated protein は EGCg の標的候補分子になりえる可能性が示唆された。現在、Native−PAGE や分離能の高い二次元電気泳動を用いてさらなる検討を行っている。

target molecule, EGCg, glucose uptake

発表責任者：池田真規（ike.gle.sindai@gmail.com）

講演番号：4A04a11
講演日時：3 月 20 日 12:00～ A 校舎 04 会場

# マウス摘出腸管機能に及ぼすキャベツ酢等の影響

# Effects of cabbage vinegar on some functions in isolated intestines of mice

○寺島 和哉[1]、石原 智[2]、本間 知夫[1]([1]前工大院、[2]群馬県農技センター)
○Kazuya TERASHIMA[1], Satoru Ishihara[2], Tomoo Homma[1] ([1]Maebashi Inst. Tech., [2]Gunma Agri. Tech. Center)

［目的］群馬県農業技術センターが嬬恋村、川場村農産加工(株)と共同開発した「キャベツ酢」の腸管機能に及ぼす影響を、マウス摘出腸管を用いて調べることを目的とした。
［方法］＜サンプル調製＞キャベツ酢（群馬県農業技術センター提供）は pH が 3 程度であるが、摂取した場合、腸管には中和された状態で作用すると思われるため、pH7.4 に調製したものをサンプルとして使用した。また、比較として穀物酢及び酢酸溶液についても同様に調製して使用した。
＜糖質分解及び糖吸収＞マウス(ddY、♂、5 週齢以上)より摘出した小腸を上部、中部、下部に分け(各部はさらに 3 等分した)、それぞれ反転腸管標本を作製し、0.5%デンプンあるいは 10mM グルコース＋各種サンプルを含むリンガー液に浸漬した。混合ガス(95%$O_2$/5%$CO_2$)通気下、37℃で 20、40、60 分後の粘膜側及び漿膜側の各液グルコース濃度を求め、腸管 1g 当たりのグルコース生成量及び漿膜側へのグルコース吸収量を算出・比較して、各種サンプルの糖質分解及び糖吸収に対する影響を評価した。
＜腸管運動＞マウスより摘出した腸管を空腸、回腸、結腸、直腸に分け、2～3cm に切り分けてマグヌス管にセットし、Krebs 緩衝液あるいは各種サンプルを含む Krebs 緩衝液におけるアセチルコリン(ACh)投与による収縮を観察・比較した。また Krebs 緩衝液中に各種サンプルを投与した場合の腸管に与える影響も調べた。ACh による収縮はサンプルを含まない場合を収縮率 100%とし、各種サンプル存在下における収縮率を比較することで腸管運動に対する影響を評価した。
［結果］＜糖質分解及び糖吸収＞各種サンプルが存在しても生成グルコース量に違いは見られず、キャベツ酢等の糖質分解に対する影響はないと思われた。グルコース吸収量は時間経過と共に増えたが、各種サンプル存在下では酸度依存的に糖吸収が阻害されることが分かった。
＜腸管運動＞ACh による収縮は各種サンプルの酸度が高くなる程抑制された。また各種サンプルの単回投与により腸管はわずかに収縮したが、直腸では弛緩する場合も見られた。
［考察］各種サンプル（キャベツ酢、穀物酢、酢酸溶液）による結果から、共通成分である酢酸が糖吸収及び腸管運動を阻害する要因であることがわかった。またキャベツ酢は、穀物酢及び酢酸溶液と比較して、より低い酸度でグルコース吸収を阻害していたことから、キャベツ酢に含まれる何らかの成分がさらに影響を及ぼしている可能性が示唆された。しかしその作用機序は不明であり、現在検討を進めているところである。

cabbage vinegar, acetic acid, intestines

発表責任者：本間知夫（thomma@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：4A04a12
講演日時：3 月 20 日 12:15～ A 校舎 04 会場

# 1-ケストースのプレバイオティクス効果

# The prebiotic effect of 1-kestose in rats

○高橋 基毅[1]、神尾 里奈[1]、栃尾 巧[2]、遠藤 章人[3]、北浦 靖之[1]、下村 吉治[1] ([1]名大農、[2](株)物産フードサイエンス 研究開発センター、[3]東農大 生物生産)
○Motoki TAKAHASHI[1], Rina KAMIO[1], Takumi TOCHIO[2], Akihito ENDO[3], Yasuyuki KITAURA[1], Yoshiharu SHIMOMURA[1] ([1]Nagoya Univ., [2]B Food Science Co., Ltd., [3]Tokyo Univ. of agriculture)

目的

フラクトオリゴ糖は腸内フローラを改善し、宿主の免疫応答を正常に保つ効果を有していると考えられている。フラクトオリゴ糖の主成分の一つ 1-ケストースは、1 つのグルコースと 2 つのフルクトース分子から構成され、乳幼児アトピー性皮膚炎など炎症性疾患に対して有効な治療効果が示されているが、メタボリックシンドロームなどの代謝異常、インスリン感受性に対する影響については不明である。そこで本研究では、1-ケストース摂取による腸内環境および血糖値、血中インスリン濃度への影響について解析を行った。

方法

雄性 SD 系ラットに 0.5、1.0、2.5、5.0%の 1-ケストースを含む食餌を与え、体重、摂食量を継時的に測定した。４週間飼育後、血液および各種臓器、盲腸内容物を採取し、重量を測定した。また、各種血液成分および盲腸内容物中の短鎖脂肪酸量、各種腸内細菌数を測定した。

結果・考察

1-ケストース摂取により体重、摂食量に変化は見られなかったが、盲腸の肥大化がみられ、盲腸内容物量も増加した。また、盲腸内容物中の短鎖脂肪酸、各種腸内細菌数を測定した結果、1-ケストース摂取群で酢酸、乳酸、酪酸が有意に増加し、Bifidobacterium 属、Clostridium クラスターXIVa の顕著な増加が見られた。さらに 1-ケストース摂取により、血糖値に対して影響はみられなかったが、血中インスリン濃度が有意に低下した。以上の結果から、1-ケストースは腸内フローラを改善し、インスリン感受性を高めることで代謝異常を改善するプレバイオティクス効果を有する可能性が示唆された。

kestose, oligosaccharide, prebiotics

講演番号：4A05a01
講演日時：3 月 20 日 09:20～ A 校舎 05 会場

# 高リン・高マグネシウム食が骨形成ミネラルの出納およびマウス大腿骨の骨密度に与える影響

# Effect of high-phosphate and high-magnesium diet on bone forming mineral balance and mouse femur bone density

○田口 陽介、中谷 祥恵、和田 政裕、古旗 賢二 (城西大院・薬)
○Yousuke Taguchi, Sachie Nakatani, Masahiro Wada, Kenji Kobata (Josai Univ.)

【目的】カルシウム（Ca）、リン（P)およびマグネシウム（Mg）は摂取後、体内への吸収過程で相互作用することが知られている。P の過剰摂取は Ca の吸収阻害および PTH による骨吸収促進を介して骨密度を低下させるという報告が多数存在する。しかし、Mg の過剰摂取や P と Mg の同時過剰摂取による影響を検討した報告はほとんどない。そこで本研究では高 P・高 Mg 食が骨形成ミネラルの出納およびマウスの大腿骨骨密度に与える影響を検討した。
【方法】10 週齢の雄性 C57 BL/6J マウスを通常食（N 群）、高リン食（P 群）、高マグネシウム食（M 群）、高リン・高マグネシウム食（PM 群）の 4 群に分け、6 週間飼育した。体重は 7 日毎、摂食量は 1 日毎に測定した。糞および尿は 20 日目と 40 日目に採取した。血清は解剖時に腹部大静脈より採血した。Ca、P、Mg 量は比色法で定量した。骨密度は右後脚の大腿骨を使用し、pQCT 法で測定した。
【結果】糞中 Ca 量は、N 群と比較して M 群および PM 群で有意に低値を示した。尿中 Ca 量は、N 群と比較して M 群で有意に高値を示した。血中 Ca 量は M 群で有意に高値を示した。糞中 P 量は N 食と比較して P 群、M 群および PM 群で有意に高値を示した。尿中 P 量は P 群および PM 群で有意に高値を示した。血中 P 量に差はみられなかった。糞中 Mg 量は N 群と比較して M 群、PM 群で有意に高値を示した。尿中 Mg 量は M 群のみ有意に高値を示した。また、血清 Mg 量は M 群および PM 群で有意に高値を示した。右後脚大腿骨の骨密度は N 群と比較し、P 群、M 群および PM 群で低値を示した。
【考察】P 群における骨密度の低下の原因として、尿・血清中 Ca 量は変化せず尿中 P 量が増加していたことから、高 P 食で体内に過剰の P が吸収され、体内の Ca と結合して異所石灰化を誘導している可能性が考えられた。M 群では糞中 P、Mg 量および尿・血清中 Ca 量が高値であったことから、消化管で過剰の Mg が P と結合し体内の P が不足したことで骨の石灰化が妨げられ、結果として骨密度が低下したと考えられる。PM 群では糞中 Ca 量が減少していた。このことから、Mg の P 吸着作用によって吸収性の Ca が増加した結果、Ca の体内吸収が増加していた可能性が考えられた。しかし、過剰の P と Mg も体内吸収されていることから、異所石灰化が起きている可能性があり、これが骨密度の低下を招いていると考えた。本研究では、高 P 食の摂取だけでなく高 Mg 食の摂取においても骨密度が低下することを示した。また、骨密度が低下する作用メカニズムは、高 P 食と高 M 食で異なる可能性がある。

high phosphate diet, bone density, mineral balance

講演番号：4A05a02
講演日時：3 月 20 日 09:35～ A 校舎 05 会場

カルシウムの取りすぎは、記憶能力を低下させる
Extra intake of calcium carbonate causes memory impairment
○井上 達郎、冨士 達矢、長谷川 靖 (室工大院)
○Tatsuro INOUE, Tatsuya FUJI, Yasushi HASEGAWA (Muroran I.T.)

（目的）血中のカルシウム濃度は、副甲状腺ホルモンやビタミンＤなどによって一定に保たれているが、カルシウム不足は、疲労やイライラ、骨粗鬆症などを引きおこすことが報告されている。カルシウム摂取量と記憶の関係についての研究は少なく、低カルシウム食（0.02%カルシウム）を食餌したラットでは、作業記憶能が低下することが報告されている一方、認知症患者にカルシウムを摂取させることで記憶が低下することも報告もされている。本研究では、カルシウム摂取と記憶能力の関係性を明らかにすることを目的とし研究を行った。
（方法）①低ミネラル食（0.19%カルシウム)、②高ミネラル食（0.33%カルシウム）③炭酸カルシウム 1%を含む低ミネラル食（0.58%カルシウム）を 2 か月間食餌させたマウスを用い、Ｙ字迷路試験、バーンズ迷路試験、物体認識試験を行った。また、抗不安の指標となる高架式迷路試験も行った。
　試験終了後、脳を摘出し大脳皮質中の酸化傷害の評価、アセチルコリンエステラーゼ活性、記憶に関わる CREB のリン酸化量の定量等を行った。
（結果） １）Y 字迷路試験、新奇物体認識試験において、カルシウムを多く含む餌③を食べたマウスで短期記憶、物体認知記憶の有意な低下が認められた。バーンズ迷路試験において、暗所の穴を記憶するまでの時間に有意な差を見出すことはできなかったが、プローブ試験においてカルシウムを多く含む餌を食べたラットで記憶の低下が認められた。
２）低ミネラル食①と高ミネラル食②を食べたマウス間で短期記憶、物体認知記憶の有意な差は見られなかった。
３）③の餌にカルシウムイオンチャネルブロッカーである 0.1%ニモジピンを添加した餌を食べたマウスでは短期記憶、物体認知記憶の低下は認められなかった。
４）高架式十字迷路試験で不安様行動に差を認めることができなかった。
５）大脳皮質中で過酸化脂質量、グルタチオン量、アセチルコリンエステラーゼ活性に有意な変化は見られなかった。一方、カルシウムを多く含む餌を食べたマウスの大脳皮質中で CREB のリン酸化量が有意に低下していることが明らかになった。
現在、記憶能力の低下を引き起こす原因を明らかにするため、海馬での遺伝子発現量の変化等について検討を行っている。

calcium, memory, mouse

講演番号：4A05a03
講演日時：3 月 20 日 09:50～ A 校舎 05 会場

温州ミカンβ-クリプトキサンチン含有量の貯蔵期間中の推移
Transition of ß-cryptoxanthin content of *citrus unshu* during storage
○新居 美香、梯 美仁（徳農技セ）
○Mika Nii, Yoshihirto Kakehashi (TAFF TSC)

【背景・目的】
温州ミカンには機能性成分の β-クリプトキサンチンが含まれ、機能性表示食品としての届出が可能である。徳島県は３月から４月に出荷する貯蔵ミカンの産地であり、12 月に収穫した果実を常温で貯蔵して出荷する。カンキツ果実の β-クリプトキサンチン含有量は、結果期間が長いほど多くなるといわれている。また、貯蔵期間中には糖度が上昇し、減酸が進むことは従来の栽培･調査で明らかになっているが、果実に含まれる β-クリプトキサンチン含有量の推移については不明であった。そこで本研究では、貯蔵期間中の果実に含まれる β-クリプトキサンチン含有量の推移を明らかにすることを目的として実施した。

【方法】
試料は 12 月に収穫した十万温州ミカン(30 年生)を樹別に常温貯蔵庫で貯蔵した果実を定期的に採取して用いた。調査果数は 1 回 12 果とし、期間は収穫直後から 3 月末までとした。果実成分として、β-クリプトキサンチン含有量、糖度、酸度、アスコルビン酸含量の分析を行った。

【結果および考察】
果実品質について、糖度は、収穫直後から 3 月まで、ほとんど変化は見られなかった。酸度は貯蔵期間中に減少し、糖酸比が高くなる傾向が見られた。アスコルビン酸含有量については、貯蔵期間中を通じて緩やかに減少する傾向が見られた。β-クリプトキサンチン含有量は、貯蔵開始から 1 ヶ月の間に 30%以上増加し、その後も 3 月上旬頃まで緩やかに増加したが、収穫後 3 ヶ月を経過した 3 月下旬には減少する傾向が見られた。これらのことから、温州ミカン果実のβ-クリプトキサンチンは、収穫後 1 ヶ月程度は果実内で合成されていること、貯蔵終盤には分解する

Citus unshiu, strage, ß-cryptoxanthin

発表責任者：新居　美香（nii_mika_1@pref.tokushima.jp）

講演番号：4A05a04
講演日時：3 月 20 日 10:05～ A 校舎 05 会場

# 養液栽培法によるホウレンソウの機能性向上

# Preparation of biofunctional spinach by strategic hydroponics

○渡辺 祥[1]、立上 陽平[1]、大谷 優太[1]、青木 航[1,3]、雨宮 崇[2]、助清 泰教[2]、窪川 清一[2]、植田 充美[1,3] ([1]京大院・農・応用生命、[2]三菱樹脂株式会社、[3]京都産業科学技術総合イノベーションセンター)
○Sho WATANABE[1], Yohei TATSUKAMI[1], Yuta OTANI[1], Wataru AOKI[1,3], Takashi AMEMIYA[2], Yasunori SUKEKIYO[2], Seiichi KUBOKAWA[2], Mitsuyoshi UEDA[1,3] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Mitsubishi Plastics, [3]KIST-BIC)

**【背景】**ヒトは葉酸を合成できないため、食物からの摂取が必要とされている。葉酸はビタミン B 群に属し、赤血球の産出やアミノ酸の代謝あるいは核酸（DNA や RNA）の産生に重要な機能を有している。食物に含まれる葉酸量は非常に少量であり、推奨される葉酸量（一般成人は 240 μg/日、妊婦の場合は胎児の脳の発達に関与するため 440 μg/日が求められる）を摂取することが難しい。これまでの農作物を対象にした葉酸含有量増加の試みは、主に遺伝子操作によるものである。しかしながら遺伝子組み換え作物の流通は制限されているため、本研究では、サラダホウレンソウを対象に、栽培条件の改良やターゲットメタボローム解析を用いて葉酸含有量が増加した機能性ホウレンソウの作成に取り組んだ。
**【方法】**これまでにサラダホウレンソウの水耕栽培系は確立されている。本研究では、水耕栽培用の液肥に葉酸含有量の増加が期待できる化合物を添加し、サラダホウレンソウの栽培を行った。葉酸系化合物の同定、定量は高速液体クロマトグラフィーと三連四重極型質量分析計（LC - MS/MS）を用いて行った。
**【結果】**特定の化合物を含む液肥で栽培したホウレンソウサンプルでは、通常のサンプルと比較して葉酸増加が確認できた。また、これらの化合物添加が葉酸の生合成量を増加させた分子機構の考察を含め、結果をまとめて報告する[1]。

[1] Watanabe *et al* submitted.

Hydroponics, Biofunctional, Spinach

発表責任者：渡辺 祥（watanabe.sho.36z@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4A05a05
講演日時：3 月 20 日 10:20～ A 校舎 05 会場

# ピロロキノリンキノンとイミダゾロピロロキノリンの神経系細胞への効果の比較検討

# Comparison of the effects of pyrroloquinoline quinone and imidazole pyrroloquinoline on neural cells

○西居 和哉、中路 昌志、中西 慧、山田 康枝（近畿大工）
○Kazuya Nishii, Masasi Nakamichi, Kei Nakanishi, Yasue Yamada (Kindai Univ.)

【緒言】．ピロロキノリンキノン（PQQ）はキウイ，ピーマン，母乳など様々な食品に含まれ，抗酸化作用や神経保護作用，細胞増殖促進作用，ミトコンドリア増強作用があるとされている．PQQ はアミノ酸と容易に反応しイミダゾール骨格を形成し，イミダゾロピロロキノリン (IPQ)となることが知られている．IPQ は母乳中に PQQ の 70 倍多く含まれていると言われ，生体内では IPQ として存在している可能性がある．しかし、その効果は明らかにされていない．本実験では，神経細胞に特異的に毒性を発揮する 6-ヒドロキシドパミン (6-OHDA)と過酸化水素 ($H_2O_2$), $Ca_2^+$-ATPase(SERCA)阻害剤で小胞体ストレスを誘導するタプシガルギン (TG)に対する保護効果を PQQ と IPQ で比較検討するために，ヒト神経芽細胞腫株 SK-N-SH を用いた．また、細胞増殖促進効果，細胞毒性についても比較検討し、ミトコンドリア量の指標となる Human COX4/1 (シトクロム c オキシダーゼ)と PGC1α (PPAR-γ-co-activater-1α)の発現量も測定した．

【方法】SK-N-SH $1.0\times10^5$ cells/ml に調整し 96well マイクロプレートに播種し，24 時間 37℃5%$CO_2$ インキュベーター内で培養した．培養後，保護作用を検討する物質を添加し 10 分間インキュベートし，室温で $H_2O_2$ を加え 10 分間，または 6-OHDA を加え 24 時間，TG を加え 24 時間培養した．その後，MTT assay 法により，細胞生存率を求めた．細胞増殖は播種後 1 時間静置し，検討物質を添加後，0，24，48，72 時間培養後，MTT assay 法により細胞生存率を求めた．PQQ 及び IPQ を添加し，24 時間培養した SK-N-SH 細胞における Human COX4/1, PGC1α の発現量を測定するために TaqMan プローブを用いて RT-PCR を行った．

【結果・考察】IPQ は PQQ よりも細胞毒性が低いということが明らかとなった．PQQ と IPQ は細胞増殖効果を示し，1 nM PQQ と還元型 PQQ は，72 時間で最も高い効果を示した．PQQ と還元型 PQQ は 5 mM $H_2O_2$ による細胞死に対して保護効果を示した．また，IPQ は 1～5 μM で有意な保護効果を示した．6-OHDA は 50 μM と 100 μM による細胞死を PQQ ，還元型 PQQ は 100 nM で細胞保護効果を示した．また，6-OHDA 100 μM の細胞死に対して IPQ は保護効果を示した．TG による細胞死に対して，PQQ 及び IPQ は保護効果を示さなかった． PQQ，還元型 PQQ，IPQ 存在下でミトコンドリア COX と PGC1α の発現量が増加した．以上の結果から，IPQ は PQQ と同様に細胞増殖効果，ミトコンドリア増加効果を示すことが明らかとなった．また，$H_2O_2$ と 6-OHDA 対しても効果濃度に違いがあるが，保護効果を示すことが明らかとなった．

pyrroloquinoline quinone, imidazole pyrroloquinoline, cell growth-promoting

講演番号：4A05a06
講演日時：3 月 20 日 10:35～ A 校舎 05 会場

# ビタミン K が海馬におけるステロイド産生に及ぼす影響

# The effect of vitamin K on steroidogenesis in hippocampus

○岡田 菜緒、白川 仁、何 欣蓉、後藤 知子、駒井 三千夫（東北大・院農・栄養学）
○Nao OKADA, Hitoshi SHIRAKAWA, Hsin-jung HO, Tomoko GOTO, Michio KOMAI (Tohoku Univ.)

【目的】ビタミン（VK） は、VK 依存性タンパク質の Glu 残基の γ-カルボキシル化（Gla 化）を行う酵素 γ- glutamylcarboxylase（GGCX）の補因子として作用し、血液凝固や骨代謝に関与する。天然には植物由来の VK1（フィロキノン）と、主に微生物由来の VK2（メナキノン：MK-n）が存在する。脳、精巣、膵臓などの組織には MK-4 が多く含まれており、食餌由来の VK の一部がこれらの組織内で MK-4 に変換されることが知られているが、この生理学的意義は未だ明確でない。VK の新規作用として、ステロイドホルモンの一つであり、男性ホルモンであるテストステロン（Ts）の産生を促進することが示されている。精巣で産生される Ts は生殖機能に関与する一方で、脳の海馬でも Ts が産生されており、神経保護作用を持つことが報告されている。本研究では、海馬のステロイド産生に及ぼす VK の影響を解析した。
【方法】Slc: Wistar（8 週齢、雄）にコントロール食（Cont：VK1 0.75mg / kg diet）、VK1 添加食（VK1 sup：VK1 75mg / kg diet）、MK-4 添加食（MK-4 sup：MK-4 75mg / kg diet）を 28 日間給餌し、海馬と血漿を採取した。蛍光 HPLC 法を用いて海馬の VK 濃度を定量し、ELISA 法にて海馬と血漿のステロイドホルモン濃度を測定した。
【結果】海馬の MK-4 濃度は Cont 群と比較して VK1 sup 群、MK-4 sup 群で有意に高く、更に VK1 sup 群 では MK-4 sup 群より有意に高値であった。海馬における Ts 濃度は VK1 sup 群では変化は見られなかったが、MK-4 sup 群では有意に低下した。一方、Ts の前駆体であるプロゲステロン（Ps）濃度は VK1 sup 群では有意に上昇したが、MK-4 sup 群では変化しなかった。血漿の Ps 濃度は群間で差が見られなかったことから、血漿中の Ps が海馬に流入したのではなく、海馬での Ps 産生が促進されたと考えられた。Ts から変換される女性ホルモンであるエストラジオール（E2）にも神経保護作用が報告されているが、海馬における E2 濃度には群間で差は見られなかった。以上のことから、海馬中の MK-4 濃度により海馬のステロイド産生（Ps 産生）が変化する可能性が示唆された。

Vitamin K, Hippocampus, Steroidogenesis

講演番号：4A05a07
講演日時：3 月 20 日 11:00～ A 校舎 05 会場

ビタミン欠乏が卵母細胞の質におよぼす影響
Effect of vitamins deficiency on oocyte quality
○辻 愛[1]、中村 肇伸[2]、柴田 克己[3]（[1]神戸学院大栄養、[2]長浜バイオ大アニマルバイオ、[3]滋賀県大生活栄養）
○Ai TSUJI[1], Toshinobu NAKAMURA[2], Katsumi SHIBATA[3] ([1]Kobe Gakuin Univ., [2]Nagahama Bio., [3]Shiga Univ.)

【目的】卵母細胞の質の低下（減数分裂時の紡錘体形成異常や染色体不整列）は，流産や染色体異常児の原因となる．高脂肪食および亜鉛欠乏マウスの卵母細胞の質が低下するという報告があり，栄養素と卵母細胞の質の関係が示唆されている．本研究では，水溶性ビタミンのビタミン $B_1$（$V.B_1$）とビオチンの各欠乏が，卵母細胞の質（異常卵母細胞の頻度で評価）におよぼす影響を明らかにすることを目的とした．
【方法】**$V.B_1$ 実験**：ICR マウス（6 週齢，メス）を 2 群に分けた．対照群には 20%カゼイン食を与え，$V.B_1$ 欠乏群には $V.B_1$ 欠食を与えた. 飼育 20 日目に過排卵処置にて, 減数分裂途中の卵母細胞を得た．卵母細胞の紡錘体および染色体を染色し，異常卵母細胞（紡錘体形成異常や染色体不整列を有する卵母細胞）の割合を調べた．次に，栄養状態を回復させる目的で，飼育 21 日目から $V.B_1$ 欠乏群に 20%カゼイン食を与えた（$V.B_1$ 回復群）．対照群には 20%カゼイン食を与えた．飼育 63 日目に対照群と $V.B_1$ 回復群の卵母細胞を採取し，異常卵母細胞の割合を調べた．卵巣 $V.B_1$ 濃度を測定した．
**ビオチン実験**：ICR マウス（4 週齢，メス）を 2 群に分け，対照群には 30%卵白たんぱく食を与え，ビオチン欠乏群にはビオチン欠食を与えた．飼育 21 日目に，対照群とビオチン欠乏群の卵母細胞を採取し，異常卵母細胞の割合を調べた．次に，飼育 22 日目に，ビオチン欠乏群を 2 群に分け，一方には 30%卵白たんぱく食を与え，もう一方にはビオチン欠食を与えた．対照群には 30%卵白たんぱく食を与えた．飼育 42 日目に，対照群，ビオチン欠乏群および回復群の異常卵母細胞の割合を調べた．卵巣ビオチン濃度を測定した．
【結果・考察】**$V.B_1$ 実験**：$V.B_1$ 欠乏群の卵巣 $V.B_1$ 濃度は対照群より低かった．飼育 20 日目において，$V.B_1$ 欠乏群の異常卵母細胞の割合は対照群の約 3.2 倍高かった．飼育 63 日目では，回復群の卵巣 $V.B_1$ 濃度は対照群と差は認められず，異常卵母細胞の割合は対照群と同じレベルにまで低下していた．
**ビオチン実験**：飼育 21 日目において，ビオチン欠乏群の卵巣ビオチン濃度は対照群より有意に低く，異常卵母細胞の割合は約 2.4 倍高かった．飼育 42 日目では，回復群の卵巣ビオチン濃度は回復していたが，異常卵母細胞の割合は対照群より高いままであった．また，この時のビオチン欠乏群の異常卵母細胞の割合も，対照群に比べて 3.2 倍高かった．
【結論】$V.B_1$ 欠乏は減数分裂に影響し，ビオチン欠乏は減数分裂と減数分裂前の未成熟卵子に悪影響を与えることが示唆された．水溶性ビタミンによって卵母細胞への影響が異なることが示唆された．

Biotin, Vitamin $B_1$, Oocyte

発表責任者：柴田克己（kshibata@shc.usp.ac.jp）

講演番号：4A05a08
講演日時：3 月 20 日 11:15～ A 校舎 05 会場

# 没食子酸がビタミン C トランスポーターSVCT1(SLC23A1)を介したビタミン C 取り込みに与える影響

# Effect of gallic acid against uptake of vitamin C through SVCT1(SLC23A1)

○池島 俊季、荒川 充、石川 亜紀子、山口 実希子、佐藤 由香沙、太刀川 晃生 (ディーエイチシー)
○Toshiki IKEJIMA, Mitsuru ARAKAWA, Akiko ISHIKAWA, Mikiko YAMAGUCHI, Yukasa SATOU, Kousei TACHIKAWA (DHC Corp.)

【目的】ビタミン C(アスコルビン酸)は様々な生理活性を有し、化粧品及び医薬品等、多方面に応用されている。ビタミン C を皮膚に適用する際の課題として、安定性、経皮吸収の難が挙げられる。この課題を解決する手段として、安定性についてはビタミン E、ポリフェノール等の抗酸化物質との併用によって安定性が向上することが知られている。一方、経皮吸収に関してはビタミン C トランスポーター(SVCT)発現促進剤の併用によってビタミン C の細胞内取り込み量が向上すると考えられている。よって、抗酸化効果を持ち、かつ、SVCT 発現促進効果を有する成分は、ビタミン C の効果を最大限に発揮させるという観点において有用であると考えられる。そこで我々は、ビタミン C の安定性を向上させる抗酸化物質の中でもポリフェノールに着目し、ポリフェノールの SVCT を介したビタミン C 取り込み量増加作用とそれのもたらす効果について検討を行った。
【方法】正常ヒト表皮角化細胞(NHEK)及び B16 メラノーマ細胞の細胞内ビタミン C 取り込み量の測定はビタミン C 定量キットを用いた。NHEK の SVCT1 及び各分化マーカーの発現は Westernblotting 法により解析を行った。メラニン産生抑制試験は B16 メラノーマ細胞にビタミン C 及びビタミン C 誘導体を添加した際のメラニンを回収し、NaOH によって可溶化し、570nm の波長にて吸光度を測定した。
【結果・考察】NHEK への各種ポリフェノール添加による SVCT1 発現への影響を検討した結果、没食子酸に SVCT1 発現促進作用を見出した。NHEK において没食子酸とビタミン C 併用時、ビタミン C の細胞内取り込み量は有意に増加し、また、各分化マーカータンパク質はビタミン C 単独添加時と比較して没食子酸併用によって発現量の増加を示した。B16 メラノーマ細胞にビタミン C 及びビタミン C 誘導体を添加したところ、ビタミン C、ビタミン C 誘導体共に没食子酸との併用によって取り込み量が増加し、メラニン産生抑制試験においても取り込み量と相関して抑制効果が見られた。以上の結果より、没食子酸は SVCT1 発現促進効果により NHEK、B16 メラノーマ細胞のビタミン C 取り込みを促進させ、ビタミン C の分化促進効果並びにメラニン産生抑制効果を相乗的に高める可能性が示された。元来、ビタミン C はポリフェノールとの併用によって安定性が向上することが知られていたが、没食子酸を選択することにより、抗酸化作用によるビタミン C 安定化効果だけでなく、ビタミン C の細胞内取り込み量を増加させる効果を付与できる可能性が示唆された。本知見を用いることで、ビタミン C の効果を最大限に発揮させる化粧品への応用が期待される。

Gallic acid, Polyphenol, Sodium-Dependent Vitamin C Transporter 1

講演番号：4A05a09
講演日時：3 月 20 日 11:30～ A 校舎 05 会場

# 培養ミクログリア細胞におけるビタミン K2 の抗炎症効果

# Anti-inflammatory effect of vitamin K2 in cultured microglia cells.

○青山 奈央、白川 仁、後藤 知子、駒井 三千夫（東北大・院農・栄養学）
○Nao AOYAMA, Hitoshi SHIRAKAWA, Tomoko GOTO, Michio KOMAI (Tohoku Univ.)

【目的】ビタミン K （VK）は、植物由来の VK1 と主に微生物由来の VK2 が天然に存在する。血液凝固因子や骨タンパク質の活性化の補因子として機能していることから、肝臓や骨において比較的高い濃度で存在している。しかしラットなどにおいて、VK は脳内にも多量に存在し、その多くは VK2 のひとつである、メナキノン-4（MK-4）である。我々は、 MK-4 がマクロファージ様細胞であるヒト THP-1 やマウス RAW264.7 において NFκB の活性化を阻害することで、炎症性サイトカインの発現を抑制し、抗炎症作用を示すことを報告した。そこで、脳内に存在する MK-4 も抗炎症作用を示す可能性が考えられることから、本研究では、マウスミクログリア細胞株である MG6 細胞を用いて、 MK-4 による炎症関連遺伝子発現への影響を解析した。
【方法】 MG6 細胞を MK-4 で一定時間、前処理した後、リポポリサッカライド（LPS）、または TNFα で処理し、3 時間後にトータル RNA を回収した。定法に従い、 cDNA を作成後、定量 PCR で炎症性サイトカイン、および炎症関連遺伝子の mRNA 量を測定した。また、 NFκB の活性化に関連するタンパク質量をウエスタンブロット法で測定した。さらに、 ELISA を用いて培地中の炎症性サイトカイン量を測定した。
【結果】 MK-4 で 24 時間前処理した場合、 LPS および TNFα により誘導される、 IL-1β 、TNFα の mRNA 量は有意に減少した。また、 IL-1β mRNA 量は MK-4 の前処理時間に関係なく、 MK-4 の濃度依存的に減少した。このことは、マクロファージ様細胞で見られた、 MK-4 による炎症性サイトカインの発現抑制とは異なる結果であった。また、 NFκB のサブユニットのひとつである p65 のリン酸化量は有意に減少した。以上の結果から、MK-4 は MG6 細胞において、炎症刺激による NFκB の活性化を阻害し、炎症関連遺伝子の発現を抑制するが、マクロファージ様細胞とは異なるメカニズムで、抗炎症作用を示すことが示唆された。

vitamin K, aniti-inflammation, cultured cells

講演番号：4A05a10
講演日時：3 月 20 日 11:45～ A 校舎 05 会場

# ラット反転腸におけるアスコルビン酸吸収に及ぼすリンゴ果汁の効果

# Effect of apple juice on ascorbic acid absorption in rat's intestinal everted sacs

○井澤 弘美、石戸谷 春花、佐々木 貴和子（青森県立保健大学栄養）
○Hiromi IZAWA, Haruka ISHIDOYA, Kiwako SASAKI (Aomori Univ. of Health and Welfare)

【緒言】リンゴには他の果物と比較してアスコルビン酸(Ascorbic Acid;AsA)含量が少ない(4mg/100g)。しかしながらリンゴ果汁を摂取しているラットでは、AsA が様々な臓器に蓄積されることがこれまでの実験で明らかとなった（2015、2016 農芸化学会大会)。この現象はリンゴ果汁が消化管に作用して AsA の吸収や各臓器への輸送を促進させていることが推察された。そこでリンゴ果汁を摂取させたラットの反転腸を用いて AsA の吸収を調べた。
【研究方法】ODS 雄性ラットを用い、対照群（Ctrl 群）と 2%リンゴ果汁溶液摂取群（AJ 群）に分け、飲料水として Ctrl 群には、2g/L AsA 溶液を与え、AJ 群には、2g/L AsA を含む 2%リンゴ果汁溶液を与えた。飼料及び飲料水は実験終了時まで自由摂取させた。10 週間の飼育後解剖し、小腸を取り出して 3 等分し、胃側より十二指腸、空腸、回腸にわけた。この小腸各部位を AsA 測定及び反転腸の AsA 吸収実験に用いた。なお、飼育中の AsA 摂取量に群間の差は見られなかった。
【結果および考察】小腸各部位に含まれる AsA は、両群間で有意差は認められなかった。AsA を含まない溶液を反転腸の内液とし、AsA を含む溶液を反転腸の外液として、さらに外液にリンゴ果汁の有無別で、反転腸が AsA を内腔に取り込む実験を行った。その結果、反転腸外液でのリンゴ果汁の有無に関わらず、AJ 群の小腸の各部位の反転腸内液の AsA 濃度は、Ctrl 群の小腸各部位に対して有意に高値を示した。また、外液に AJ が無いときの反転腸外液の AsA 量の減少率は、AJ 群の十二指腸において Ctrl 群の十二指腸より有意に高値を示したものの、これ以外の外液の AsA 量の減少率は、両群間に有意差は認められなかった。これらの結果から、両群とも消化管内腔から小腸細胞への AsA の取り込み量はほぼ同じであるが、小腸細胞から全身への AsA の輸送では、AJ 群が Ctrl 群よりも全身への AsA 輸送を促進させることが示唆された。

apple, ascorbic acid, intestinal everted sacs

発表責任者：井澤弘美（h_izawa@auhw.ac.jp）

講演番号：4A06a01
講演日時：3 月 20 日 09:20～ A 校舎 06 会場

# マヨネーズの粘度におよぼす乳化時の pH の影響

# Effect of pH at emulsification on viscosity of mayonnaise

○下山田 真[1]、神田 絢美[1]、増田 勇人[1]、石川 愛子[2]、餅田 浩基[2] ([1]静岡県大、[2](株)鈴与総研)
○Makoto SHIMOYAMADA[1], Ayami KANDA[1], Hayato MASUDA[1], Aiko ISHIKAWA[2], Hiroki MOCHIDA[2] ([1]Univ. Shizuoka, [2]Suzuyo Res. Inst. Co. Ltd.)

［目的］マヨネーズは卵黄と酢と食用油からなるエマルションであり、卵黄中のタンパク質等を構成要素とする複合体粒子が乳化力に重要な役割を果たしていることが知られている。エマルションの調製時にはあらかじめ添加してある酢の存在によって混合物の液性は酸性になることもある。この場合、タンパク質は酸変性を受けた状態でエマルションを形成することとなる。本研究では最初に添加する酢の量を変化させることで乳化時の pH を変化させ、異なる pH で乳化したマヨネーズの流動特性を解析することとした。
［方法］マヨネーズの配合は 10%加塩卵黄（14 g)、高酸度酢（8 g)、食用油(156 g)、上白糖（3 g)、食塩（2 g)、水（15 g）とした。乳化時に混合する酢の量をコントロールすることで、乳化時の pH を 5.0、4.5、4.0 と変化させた。卵黄、水、食塩等の材料と必要量の高酸度酢を混合し、ホモゲナイザーで均質化した。この混合液をミキサーに入れて、食用油を滴下して乳化操作を行った。さらに残りの酢を添加、撹拌してマヨネーズとした。
得られたエマルションはデジタル式の B 型粘度計（英弘精機）を用いて回転数を 0.5 rpm から 20 rpm まで変化させて粘度を測定するとともに、回転数（ずり速度）とトルク（ずり応力）の関係より流動特性を解析した。
［結果］各 pH において乳化を行った後に残りの食酢を添加してマヨネーズを調製したところ、それぞれの粘度は乳化時の pH が低下するにつれて小さな値を示した。一方、横軸を回転数の自然対数とし、縦軸をトルクの自然対数としてプロットすると直線が得られたので、この回帰直線より粘性指数を求めた。その結果、粘性指数は pH を変化させても有意な差は見られなかった。以上の結果より乳化時の pH の低下ともなってマヨネーズの粘度は低下するものの、エマルションの構造が大きく変化するものではないものと推測された。

mayonnaise, viscosity, egg yolk

講演番号：4A06a02
講演日時：3 月 20 日 09:35～ A 校舎 06 会場

# 脂肪球が乳タンパク質による泡沫の安定性に及ぼす影響

# Stability of milk protein foams as affected by fat particles

○大野 智未[1]、松宮 健太郎[1]、小杉 達也[2]、久保内 宏晶[2]、松村 康生[1]([1]京大院農、[2]雪印メグミルク(株))
○Satomi ONO[1], Kentaro MATSUMIYA[1], Tatsuya KOSUGI[2], Hiroaki KUBOUCHI[2], Yasuki MATSUMURA[1] ([1]Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ., [2]Megmilk Snow Brand Co., LTD.)

【背景と目的】食品中に含まれる気泡の安定性は、油脂、タンパク質、乳化剤など様々な成分に影響を受ける。特に、ホイップクリームにおいては、適度な SFC を持つ脂肪球の存在が泡沫構造の形成に必要不可欠であると言われている。その一方で、メレンゲのような、タンパク質によって安定化されている泡沫系においては、油脂の存在は泡沫形成や泡沫安定性に悪影響を及ぼす場合がある。このように、泡沫系に油脂がどのような影響を与えるかについては未解明な点が多い。本研究では、乳化粒子の存在および乳化に用いられるタンパク質の種類が、泡沫安定性に与える影響を調べることを目的とした。
【方法】カゼインナトリウム(カゼイン Na)もしくは分離ホエイタンパク質(WPI)を用いて、固体脂含量の異なる 2 種類の植物油脂を乳化し、エマルション(pH 7.0、タンパク質終濃度 1%、油相濃度 10%)を調製した。乳化は高速ブレンダー(10000 rpm、65℃3 分間)に加え高圧ホモジナイザー(10MPa、65℃、2 回)を用いて行った。このエマルション(油相濃度 10%)および、それをカゼイン Na もしくは WPI 溶液(pH 7.0、濃度 1%)で油相濃度 1%に希釈したエマルション(油相濃度 1%)、さらに各々のタンパク質溶液(油相濃度 0%)をサンプルとした。これらのサンプルを、エスプーマアドバンス(日本炭酸瓦斯)を用いて、気相を亜酸化窒素として泡沫を調製した。泡沫安定性は、得られた泡沫の体積および排液量の経時的変化を 20℃で観察することで評価した。サンプルの粘度とゼータ電位の測定は 20℃で行った。泡沫内における各気泡の挙動を調べるために、動的フォームアナライザー(DFA 100、KRUSS)により、20℃で気泡径測定を行った。
【結果と考察】いずれのタンパク質においても、油相 0%のサンプルが最も泡沫安定性が高くなった。また、油相濃度、固体脂含量にかかわらず、油脂を含む系では、泡沫安定性は極端に低下した。いずれのタンパク質においても、油相 0%においてゼータ電位の絶対値が最も小さく、油相濃度が大きいほどゼータ電位の絶対値が大きくなるという結果になった。このことより、泡沫安定性にゼータ電位は影響しないものと考えられる。サンプル間における排液速度にはわずかに差が生じたが、サンプルの粘度に大きな差はなく、排液速度と粘度の間に明確な関連性は認められなかった。気泡径測定の結果より、油脂を含む系では気泡が十分粗大化する前に破泡することが明らかになった。以上のことから、油脂が含まれると泡沫の安定性が低下する可能性が示された。

foam stability, milk proteins, fat particles

講演番号：4A06a03
講演日時：3 月 20 日 09:50～ A 校舎 06 会場

ギス肉加熱ゲルにおける戻りとミオシン重鎖の分解動態について
Deterioration in thermal gels from deepsea bonefish *Pterothrissus gissu* meat
○中溝 量子[1]、小南 友里[1]、三根 健太郎[1]、中谷 操子[1]、岡田 茂[1]、松岡 洋子[2]、植木 暢彦[2]、万 建栄[2]、渡部 終五[3]、潮 秀樹[1] ([1]東大院農、[2]鈴廣魚肉たんぱく研、[3]北里大)
○Ryoko NAKAMIZO[1], Yuri KOMINAMI[1], Kentaro MINE[1], Misako NAKAYA[1], Shigeru OKADA[1], Yoko MATSUOKA[2], Nobuhiko UEKI[2], Jianrong WAN[2], Shugo WATABE[3], Hideki USHIO[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Suzuhiro STL, [3]Kitasato Univ.)

【目的】
日本の伝統的な水産加工食品である蒲鉾は独特の弾力を有し，その善し悪しが商品価値を左右する．魚肉加熱ゲル(調味なしの蒲鉾様のゲル)の弾力は，架橋結合によって形成されるミオシン重鎖の網目構造に依存する．一方，中低温での加熱時にゲル構造が崩壊する現象(戻り)が知られており，既往研究によって戻りの発生にはミオシン重鎖の分解が関与することが示唆されている．しかし，戻りの発生時におけるミオシン重鎖分解物の動態については明らかにされていない．そこで本研究では，中低温での加熱時に戻りが発生することが知られているギス肉を用い，ミオシン重鎖の架橋結合物および分解物の生成と物性値の関係について検討した．

【方法】
試料には相模湾で漁獲したギス（*Pterothrissus gissu*）を用いた．ギス肉から種々の加熱条件下で，加熱ゲルを作製した．得られた加熱ゲルについて破断荷重を測定した．また，加熱ゲルから水溶性成分を抽出し（水溶性画分），次いで得られた沈殿を尿素により溶解し塩溶性画分を得た．得られた水溶性画分および塩溶性画分について SDS-PAGE 解析を行い，得られたバンドについて画像解析を行った．また，SDS-PAGE で分離したタンパク質についてゲル内消化法を用いて質量分析によるタンパク質の同定を行った．

【結果】
物性測定の結果から 30-40℃で予備加熱を行った加熱ゲルで破断荷重値が低く，戻りの発生が確認された．また，水溶性画分についての SDS-PAGE 解析と画像解析の結果から，加熱条件によって 30，50，75 kDa 付近のバンドの染色強度に有意差が認められ，これらのバンドはミオシン重鎖分解物と同定された．さらに 50 kDa 付近のバンドの染色強度と破断荷重値の間に負の相関が認められた．塩溶性画分の SDS-PAGE 解析も同様に，加熱条件によってバンドパターンが異なっていた．特に戻りが起きた加熱ゲルでは約 150，170 kDa 付近のバンドの染色強度が高い傾向にあった．以上の結果から，ギス肉では 30-40℃の加熱時にミオシン重鎖の分解が進行し，その分解断片がゲルの構造物として組み込まれることがゲル構造の脆弱化の一因として示唆された．

thermal gel, gel softening, myosin heavy chain

発表責任者：潮　秀樹（aushio@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4A06a04
講演日時：3 月 20 日 10:05～ A 校舎 06 会場

# ブランド豚肉 TOKYO X と *Lactobacillus* 属乳酸菌を用いて製造した発酵ソーセージの熟成経過と品質

# Ripening status and quality of the raw *Lactobacillus*-fermented sausage using TOKYO X pork

○磯野 未来、三枝 弘育、西木 秀人、竹友 直生、細井 知弘、三枝 静江（東京都立食技セ）
○Miki ISONO, Hiroyasu SAEGUSA, Hideto NISHIKI, Naoki TAKETOMO, Tomohiro HOSOI, Shizue SAEGUSA (Tokyo Metro. Food Tech. Res. Ctr.)

【背景・目的】東京都のブランド豚肉である TOKYO X は，筋繊維が細かく，脂肪交雑が豊富であることからテーブルミートとしての人気が高い。今回，新たに，TOKYO X のモモ肉等加工部位の高付加価値化・利用拡大を図る目的で，TOKYO X と乳酸菌を用いた非加熱の発酵ソーセージ（以下サラミと表記）の開発を行うこととした。本発表では，サラミの品質に対する，乳酸菌種の影響と，TOKYO X および対照として用いた三元豚の性質の差異の影響について報告する。

【方法】TOKYO X または三元豚それぞれのモモ肉と背脂肪に，市販スターター*Lactobacillus plantarum* または *L. casei* の凍結乾燥粉末（Danisco 社）を初発最終濃度 7.5～8.1 log CFU/g となるように添加するとともに，食塩（1.5%），亜硝酸ナトリウム，硝酸カリウム，及び砂糖を加えて細切・混合し，コラーゲンケーシングに充填した。その後，温度 18℃，相対湿度 95～75%にて 28 日間熟成させ，経時的に水分活性値，pH 値，乳酸菌数等を測定した（各試験共通）。

【結果】

試験①：*L. plantarum* を用いた TOKYO X サラミにおいて，水分活性値及び水分量は，熟成工程中，経時的に低下した。熟成開始から 7 日目まで pH 値は低下，同時に乳酸量は増加し，その後，両値はほぼ一定となった。乳酸菌数は，初発菌数 7.7 log CFU/g から 7 日目には 8.8 log CFU/g まで増加し，28 日目まで維持されていた。総遊離アミノ酸量及びグルタミン酸量は，熟成開始から 14 日目まで増加し，その後一定となった。

試験②：乳酸菌 2 種による TOKYO X サラミの熟成工程中の経時的変化及び完成品の風味の差異について検討した。水分活性値及び乳酸菌数の変化，28 日目の水分量においては，*L. plantarum* を用いたサラミと *L. casei* を用いたサラミ間に大きな差は認められなかったが，*L. plantarum* を用いたサラミは，*L. casei* を用いたものと比較して，pH 値が速く低下し，28 日目の pH 値は低く，乳酸量も多かった。官能評価では，*L. plantarum* を用いたサラミの方が硬めで，酸味は強く，脂っこさは弱いとされ，総合評価が若干高かった。

現在，TOKYO X または三元豚のモモ肉と背脂肪に *L. plantarum* を接種したサラミについて検討を行っており，それらの熟成工程中の経時的変化及び完成品の風味の差異についても報告する予定である。

*Lactobacillus*-fermented sausage, TOKYO X pork, Salami

発表責任者：磯野未来（miki-isono@food-tokyo.jp）

講演番号：4A06a05
講演日時：3 月 20 日 10:20～ A 校舎 06 会場

ゴボウの硬さに関与する多糖類中のアラビノースついて
Arabinose in polysaccharide contributed to hardness of burdock
○井上 竜一（（公財）東洋食品研究所）
○Ryuichi INOUE (TIFT)

【目的】野菜・果実の硬さには、セルロース、ヘミセルロース、ペクチンが関与すると言われるが、その詳細は未だ不明な部分が多い。近年、酵素を用い、形状を保持しつつも軟らかい介護食品が開発されている。硬さに関与する成分が明らかとなれば、このような食品に使用する酵素製剤の最適化につながると考えられる。本研究では、121℃で長時間加熱しても介護食品相当まで軟化しないゴボウをサンプルとし、多糖類と硬さの関係を調べた。
【方法】ゴボウは、市販品を 5mm 厚で斜め切りにし、100℃で 5 分間加熱後、粗熱をとり、－20℃で一晩冷凍して使用した。121℃、63 分間加熱したゴボウ（硬さ：約 $10\times10^4$ N/m$^2$）、および 1%ヘミセルラーゼ「アマノ」（複合酵素製剤：アマノエンザイム社製）水溶液中で減圧処理後、40℃、3 時間反応させ介護食品相当（硬さ：$2\times10^4$ N/m$^2$ 以下）まで軟化させたゴボウを糖組成比較用のサンプルに用いた。多糖類からのアラビノースの遊離は、20mM の酢酸緩衝液（pH4）100ml に 200U の精製酵素（*Aspergillus niger* 由来α-L-arabinofuranosidase：Af もしくは endo-1,5-arabinanase：An、Megazyme 社製）およびゴボウ 20g を入れて減圧処理後、40℃、24 時間の酵素反応によって行った。ヘミセルロース、ペクチンは、定法に従い、アルコール不溶性固形物を調製後、水、ヘキサメタリン酸、塩酸、水酸化カリウムを用いて分画した。多糖類中のアラビノース含量は、トリフルオロ酢酸による単糖化処理後、TMS 誘導体化法で GC-MS を用いて測定した。
【結果】加熱処理したゴボウと、複合酵素製剤で介護食品相当まで軟化したゴボウの各種画分の糖組成を比較した結果、加熱処理品では、塩酸溶性画分のアラビノース含量が酵素処理品の 3.1 倍多く含まれていた。多糖類中のアラビノースがゴボウの硬さに影響することが示唆されたため、多糖類からアラビノースを遊離させる精製酵素での処理がゴボウの硬さに及ぼす影響を調べた。Af、An が反応し易いように、ゴボウを 121℃、33 分間加熱後にそれぞれの酵素で処理したところ、硬さは酵素未処理区に対し、Af 処理は 58%、An 処理は 70%まで軟化した。以上より、多糖類中のアラビノースはゴボウの硬さに関与すると考えられる。

arabinose, hardness, care food

発表責任者：井上　竜一（ryuuichi_inoue@shokuken.or.jp）

講演番号：4A06a06
講演日時：3 月 20 日 10:35～ A 校舎 06 会場

# 微生物を用いた食物繊維の高純度化

# High purification of dietary fiber using microorganisms

○梅村 征一郎[1]、平井 宏和[1]、濱口 徳寿[1]、吉田 信行[2]、木村 亨[1]([1]日本食品化工(株)、[2]静大院工)
○Seiichiro UMEMURA[1], Hirokazu HIRAI[1], Norihisa HAMAGUCHI[1], Nobuyuki YOSHIDA[2], Toru KIMURA[1] ([1]Nihon shokuhin kako Co.,LTD, [2]Shizuoka Univ.)

【目的】「フィットファイバー®＃８０(FF#80)」は、グルコースシラップを活性炭共存下で加熱して得られる水溶性食物繊維素材であり、食物繊維として機能する難消化性グルカン(RG)の他、二糖以下の低分子糖質が含まれる。FF#80の食物繊維画分であるRGは低カロリーで、整腸効果や血糖上昇抑制効果などの生理機能を有することが確認されている[1-2]。我々はFF#80の価値を更に高めることを目的とし、二糖以下の低分子糖質を微生物発酵により除去して、RGを高純度化する検討を行った。低分子糖質画分にはグルコースなどの消化性糖質に加え、難消化性糖質である1,6-アンヒドロ-β -D-グルコピラノース(通称レボグルコサン；LG)が含まれており、これらを効率的に除去することがRGの高純度化に必要となる。LGはレボグルコサンキナーゼ(LGキナーゼ)によって、グルコース-6-リン酸へ変換し代謝されることが知られていることから、今回LGキナーゼを有する各種微生物を活用したRGの高純度化を検討したので報告する。

【方法】FF#80 を予め糖質加水分解酵素で処理した酵素処理物（RG 溶液）を調製した。RG 溶液に発酵を促すための窒素源やミネラルを添加し、各種微生物(麹カビの *Aspergillus* 属や担子菌酵母の *Cryptococcus* 属)を植菌し、培養した。培養後の溶液をフィルター濾過、脱塩し高速液体クロマトグラフィーにより糖組成および食物繊維含量を測定した。対照区として、固形分濃度 20 質量%に希釈した上記 RG 溶液へ、LG キナーゼを有していないパン酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)を植菌し、培養した。

【結果】*S. cerevisiae* を用いて RG 溶液を処理したところ、グルコースが資化され、食物繊維含量は 78%から 86%へと上昇したが、LG は分解されなかった。また、グリセロールの産生も確認された。一方、*Aspergillus* 属、*Neurospora* 属、*Cryptococcus* 属及び *Sporidiobolus* 属を用いて RG 溶液を処理したところ、全ての菌株において LG の減少が確認された。食物繊維含量は 88～97％と *Saccharomyces* 属に比べて顕著な純度の増加がみられた。本検討において特に *Cryptococcus* 属がグリセロールの産生もなく、RG の高純度化に有効な菌種と考えられた。現在、LG 資化性菌を活用した高純度 RG 生産の実用化に向けて検討を進めている。

1：Hamaguchi N. *et al.*, *J. Appl. Glycosci.*, 62, 7-13 (2015)
2：Hirai H. *et al.*, *Jpn. Pharmcol. Ther.*, 44, 1455-1462 (2016)

dietary fiber, resistant glucan, 1,6-anhydro-ß-D-glucopyranose

講演番号：4A06a07
講演日時：3 月 20 日 11:00～ A 校舎 06 会場

## 高温で無水糖を分解可能な微生物の検索

Screening of thermophiles that can degrade an anhydro sugar

○岩崎 慎太郎[1]、吉田 信行[1]、平井 宏和[2]、濱口 徳寿[2] ([1]静大院、[2]日本食品化工)
○ Shintaro IWAZAKI[1], Nobuyuki YOSHIDA[1], Hirokazu HIRAI[2], Norihisa HAMAGUCHI[2] ([1]Shizuoka Univ., [2]Nihon Shokuhin Kako Co., Ltd.)

【目的】

「ファットファイバー®#80」はグルコースシラップを原料とし，独自の方法で製造した難消化性グルカンを含む新しい食品素材である [1]．これまでの食物繊維素材と比較して，水溶性が高く，食品への調製がしやすいなど優れた機能を有する．本製品における難消化性グルカン（食物繊維）含量は約 80%であり，その他単糖類，オリゴ糖が不純物として含まれている．食物繊維としての製品の純度を上げるためにはこれらの低分子糖質画分の除去が必要である．この糖質画分には，グルコースの 1 位と 6 位の水酸基が脱水縮合した 1,6-アンヒドロ-β-D-グルコピラノース（通称レボグルコサン，LG）という無水糖が含まれている．パン酵母を用いて低分子糖質画分を分解するプロセスを導入したが，除去効率が悪い上に副生成物としてグリセロールが生成することが問題となった．そこで，これまでにLGを炭素源として生育可能であることが知られている数種の真菌類(*Cryptococcus*属,*Aspergillus*属など [2]）を用いた新たな除去プロセスを構築中である．今回，さらに高温条件下での除去プロセスの開発を目的とし，高温（60℃）で LG を炭素源として生育可能な微生物を自然界から検索したので報告する．

【方法及び結果】

LG を唯一の炭素源とする最少培地（LG 培地）に，主に静岡県内から採取した自然サンプル（土壌，植物，湖水など）を摂取し，25℃および 60℃で振とう培養した．さらに，LG 培地に寒天を加えて調製した LG プレートを用いて，生育が認められた培養液から微生物の単離を試みた．その結果，興味深いことに，838 の自然サンプルのうち，25℃ではほとんど全てのサンプルで微生物の生育が認められた．また，60℃の培養からは 30 株の微生物を単離することができた．これらの結果はLGを資化できる微生物が広く自然界に分布していることを示しているのと同時に，環境中に LG が存在していることを示唆するものである．25℃で単離された微生物はほとんどが酵母，糸状菌であったが，60℃ではバクテリアが単離された．その中で特に良好な生育を示した 3 株について，生育特性，LG 分解能力などを検討した．生育温度については 50～60℃が最適であった．さらに薄層クロマトグラフィー分析によって，培地中の LG が時間と共に減少していることが確認できた．

1: *J. Appl. Glycosci.*, **62**, 7-13 (2015)
2: *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 515-521 (1991)

anhydro sugar, indigestible polysaccharides, thermophile

発表責任者：吉田信行（tnyoshi@ipc.shizuoka.ac.jp）

講演番号：4A06a08
講演日時：3 月 20 日 11:15～ A 校舎 06 会場

# Evaluation of antioxidant and cytoprotective activities of immature fruit extracts obtained by solvent-free extraction methods

○Ming Yuan Heng[1], Shigeru Katayama[1], Takakazu Mitani[2], Eng Shi Ong[3], Soichiro Nakamura[1]
([1]Shinshu Univ., [2]Shinshu Univ. ICCER, [3]Singapore University of Technology and Design)

【**Introduction**】Fruit thinning is a common farming practice around the world, but these immature fruits are usually treated as agricultural waste and are a major factor contributing to the 45% of food wastage each year. For the use in the processing of agricultural waste, in this study, 14 immature fruits samples were extracted using an environmentally friendly pressurized hot water extraction (PHWE) method and were compared with the traditional reflux method. The extracts were tested for their polyphenol content, antioxidant activity, and cytoprotective function.

【**Methodology**】The immature fruits extracts were prepared from Japanese Pear (*Pyrus pyrifolia*), Peach (*Prunus persica*), blueberry (*Vaccinium corymbosum*), grape (stem) (*Vitis vinifera*), grape (fruit) (*Vitis vinifera*), Japanese plum, (*Prunus thibetica*), Japanese persimmon (*Diospyros kaki*), quince (*Cydonia oblonga*), prune (*Prunus domestica*), green apple (*Malus domestica*), apricot (*Prunus armeniaca*), red apple (*Malus pumila*), nectarine (*Prunus persica* var. nucipersica) and European pear (*Pyrus communis*). The samples were dried for 72 h at 60°C, grounded using a grinder mill, and extracted using PHWE at different temperatures from 20 to 100°C in 20°C increments to establish the optimal extraction temperature. Flow rate of extraction system was 1.2 ml/min for 40 min. The polyphenol content was measured using Folin–Ciocalteu assay and antioxidant activity was evaluate using the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay. For evaluation of the cytoprotective activity, the cell viability of Crandell–Reese feline kidney (CRFK) cells treated with the extract samples in the presence of $H_2O_2$ was determined by the MTT assay.

【**Results**】The highest amount of polyphenol was extracted from grape (stem) using PHWE at 100°C or reflux extraction. This was followed by reflux extraction of grape (fruit). The results were similar for the ORAC assay. All extracts obtained from PHWE at 100°C, except immature blueberry extracts, showed cytoprotective activity against $H_2O_2$-induced oxidative stress in CRFK cells. This study demonstrated that beneficial compounds can be extracted from immature fruits without the use of organic solvents.

1) Ong, E. S., Woo, S. O., & Yong, Y. L. (2000) *J. Chromatogr A.*, 904(1), 57-64.
2) Heng, M. Y., Katayama, S., Mitani, T., Ong, E. S., & Nakamura, S. (2016) *Food Chem*.

Immature fruits, Polyphenols, Antioxidant activity

講演番号：4A06a09
講演日時：3 月 20 日 11:30～ A 校舎 06 会場

# 脱気中温中高圧処理によるパイナップルコンポートの製造条件最適化

# Optimization of process conditions for the production of pineapple compote by combinations of deaeration, medium high temperature, and medium high hydrostatic pressure

○山本 和貴[1]、UDDIN Nazim[1,2,3]、中浦 嘉子[1] ([1]農研機構食品部門、[2]BARI、[3]国連大学)
○Kazutaka YAMAMOTO[1], Nazim UDDIN[1,2,3], Yoshiko NAKAURA[1] ([1]FRI, NARO, [2]BARI, [3]UNU)

【緒言】100～300 MPa での中高圧処理の用途拡大に向けて、果実コンポート（シロップ漬）等の製造技術を開発した（特願 2015-213699)。従来のコンポートは、熱処理により製造され、加熱による液体含浸・殺菌工程において、色、香り、栄養成分が損耗するのみならず、その食感が著しく損なわれて軟化する問題があった。上記新技術では、この欠点を補うべく、脱気処理で果実中の気泡を除去してから中高圧処理することで効率的な液体含浸を実現し、更に、60℃前後の中温領域での中温中高圧処理による「自滅的発芽誘導殺菌」により、芽胞の効率的発芽を誘導しつつ中温殺菌できる。本研究では、この脱気中温中高圧処理技術をパイナップルに適用し、製造最適条件を、物性、色調、殺菌効果の視点から検討した。

【方法】市販のパイナップル（Dole 社）の非可食外皮表面を殺菌するため、次亜塩素酸水溶液（200 ppm）に浸漬してから、剥皮、芯抜き後、一辺 2 cm の立方体に切り分けた。この試料をパウチに入れ、0.08 % w/w 高甘味度甘味料、0.7 % クエン酸、0.7 %乳酸カルシウム、0.1 %NaCl、0.1 %アスコルビン酸を含む調味液を加え、脱気密封した。このパウチを試料として、液体含浸、自滅的発芽誘導殺菌のため、中温中高圧処理（100 MPa, 65 ℃, 30 分間）を施し、高圧処理（500 MPa 又は 600 MPa, 10 ℃, 10 分間）を施した試料及び熱処理（25～95 ℃）を施した試料と比較した。各処理試料の品質は、プランジャー（40mmφ）での圧縮法による物性測定（RE-33005, Yamaden 社製)、色彩色差計による色調測定（CR-400, コニカミノルタ社製)、標準寒天培地での平板塗抹法による一般生菌数測定によって評価した。

【結果】中温中高圧処理及び高圧処理では、色調、新鮮な風味が保持されつつ、軟化が抑制され、処理直後からほぼ無菌状態のコンポートに加工できることが明らかとなった。熱処理では、処理温度の上昇に伴い、物性値が低下し、食感が損なわれる傾向が見られたが、同じ中温度での処理であっても、中高圧処理の方が、物性値の低下が抑制される傾向が見られた。このパイナップルコンポートは、和菓子、洋菓子の素材として活用可能であるのみならず、発展途上国で問題となる流通中の果実減耗の減少に寄与する加工品となることが期待される。

high hydrostatic pressure, pineapple, compote

発表責任者：山本和貴（kazutaka@affrc.go.jp）

講演番号：4A06a11
講演日時：3 月 20 日 12:00～ A 校舎 06 会場

# 含塩亜臨界水中における単糖の分解の速度解析

# Decomposition kinetics of monosaccharides in salty subcritical water

○小林 敬、安達 修二（京大院農）
○Takashi Kobayashi, Shuji Adachi (Kyoto Univ.)

【緒言】亜臨界水は加圧することにより、100℃以上でも液体状態を保った水のことであり、比誘電率が低く、各種バイオマスからの有用物質の抽出が行われている。また、亜臨界水はイオン積が大きく、バイオマスに種々の反応を引き起こすことが知られており、糖やアミノ酸などに対して異性化や脱水縮合などの反応を起こすことが、明らかになりつつある。

食品の調理過程において、食塩（塩化ナトリウム）は多用され、亜臨界水の調理への応用が期待されている。しかし、亜臨界水中での食塩が果たす役割についての具体的知見は不足している。そこで、本研究では食塩水溶液を亜臨界状態に保ち、グルコースおよびフルクトースを処理し、その際に生起する反応について、速度解析を実施した。

【方法】グルコースまたはフルクトースを終濃度が 1%となるように蒸留水または食塩水（1～20%, g/g-water）に溶解した。糖溶液を管形反応器に通液し、180～220℃で亜臨界処理を実施した。得られた反応液の原料糖および生成物の濃度を HPLC で測定した。

【結果・考察】グルコースを水または 1%食塩水中で亜臨界処理（180～220℃）したところ、グルコースの分解は高温ほど速かった。また、食塩水中では反応が速かった。そして、フルクトースが主生成物として生成し、高温で処理するほど最高収率は高かったが、その分解も速かった。さらに、少量のマンノースの生成も確認された。200℃、0～20%の食塩水中でグルコースを亜臨界処理したところ、グルコースの分解は食塩濃度が高いほど加速する傾向が観測されたが、その程度は顕著ではなかった。そして、グルコースの分解は、一次反応式では表現できず、Weibull 式で表現できた。

同様に、フルクトースを蒸留水または 1%食塩水中で 180～220℃で亜臨界処理したところ、急速に分解が進行し、グルコースとマンノースの生成は確認されなかった。そして、180℃では、フルクトースの分解は一次反応で表現できた。一方、200℃以上では、反応の初期に一次反応の挙動を示したが、反応の後半では自触媒型の反応挙動を示した。これは、生成した酸性物質が分解に寄与したためであると考えられる。次いで、食塩水の濃度を 0～20%の範囲で変化させ、200℃でフルクトースを亜臨界処理したところ、食塩濃度の上昇とともに、フルクトースの分解は大幅に加速された。この分解挙動を解析したところ、何れの食塩濃度においても、反応初期は一次反応式、反応後期は自触媒型反応式で表現できた。

【謝辞】本研究はソルト・サイエンス研究財団の研究助成（No.1654）の助成により実施した。

subcritical water, salt, monosaccharide

発表責任者：小林　敬（tkoba@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4A06a12
講演日時：3 月 20 日 12:15～ A 校舎 06 会場

# n-3PUFA の探索：黒石茶等数種植物のα-リノレン酸

# Research on n-3 PUFA: α-linolenic acid of some vesitable oils

○齋藤 洋昭、平出 郁（石川県立大学）
○Hiroaki SAITO, Iku HIRAIDE (Ishikawa Prefectural Univ.)

【緒言】

n-3 高度不飽和脂肪酸（n-3PUFA）の生理機能が注目され、ドコサヘキサエン酸（DHA、22:6n-3）やイコサペンタエン酸（EPA、20:5n-3）の摂取が重要視されている。本研究では、それらの前駆体で必須脂肪酸とされるα-リノレン酸（18:3n-3）に着目し、野菜や茶での存在量を明らかにし、海産動物に代わる新たな n-3PUFA 供給源を見出だすことを目的とした。茶では固くなった葉や茎など未利用部位の脂質を解明し、新たな付加価値を見つける。

【方法】

黒石茶は葉、芽、茎の 3 部位、ルッコラとクレソンは葉と茎（根）の 2 部位に分け、それぞれの試料をメタノール－クロロホルム（Folch 法）で脂質を抽出した。カラムクロマトグラフィーで分画・精製し、トリアシルグリセロールなどの種々のクラスを得た。粗製全脂質や主要クラスはメチルエステル化し、ガスクロマトグラフィーで脂肪酸組成を分析した。

【結果・考察】

脂質含量はそれぞれ、黒石茶葉 3.0%、芽 2.7%、茎 0.7%、ルッコラ葉 0.8%、茎 0.2%、クレソン葉 0.5%、茎（根）0.2%となり、比較的高含量を示した。脂質クラス分析では、試みたすべての植物で、総脂質におけるモノガラクトシルジアシルグリセロール（MGDG）、ジガラクトシルジアシルグリセロール（DGDG）などの糖脂質が多かった。また、MGDG、DGDG の脂肪酸組成を分析したところ、非常に高い濃度でα-リノレン酸を有することが分かった。これらの結果から、黒石茶、ルッコラ、クレソンは n-3PUFA 供給源として有望であり、特に黒石茶では、利用度の低かった葉に関して、新たな用途が見つかった。

n-3 polyunsaturated fatty acid, vegetable oil, lipid

発表責任者：齋藤　洋昭（hiroakis@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：4A07a01
講演日時：3 月 20 日 09:20～ A 校舎 07 会場

# 食用ヘチマエキスの経口摂取によるドライスキン改善作用の検討

# Improvement of UV-induced dry skin by orally administered luffa extract in hairless mice

○伊藤 良一、織谷 幸太、野中 詩織、山本 貴之、柳江 高次、斎 政彦（森永製菓（株））
○Ryouichi ITO, Yukihiro ORITANI, Shiori NONAKA, Takayuki YAMAMOTO, Koji YANAE, Masahiko SAI (Morinaga & Co., Ltd.)

【目的】現代社会では冬場の湿度低下に加え夏場のエアコンによる乾きなど、一年を通じてドライシンドロームを引き起こす環境が広がっている。特に乾燥肌（ドライスキン）に関して深刻に悩んでいる人も多く、空気の乾燥に加え紫外線や加齢などによる皮膚バリア機能の低下によってさらに症状は悪化する。我々は、ドライスキンを改善する食品として食用ヘチマエキスに着目した。ヘチマは古来よりヘチマ水として使用され、顔などの肌を潤す化粧水として知られている。しかしヘチマを経口摂取することで同様の効果が得られるかは報告されていない。今回我々は紫外線を照射して皮膚バリア機能を低下させたドライスキンモデルマウスを用い、食用ヘチマエキスを経口摂取させることによる改善効果を検討した。
【方法】8 週齢の雄性ヘアレスマウス(Hos:HR-1)を順化させた後、10 週齢時の経皮水分蒸散量および角層水分量を指標に 4 群に割り付け、100 または 200 mJ/cm$^2$ の紫外線を照射した。食用ヘチマエキスまたは基剤は、紫外線照射日より 1 週間毎日強制経口投与した。ドライスキンの指標として、経皮水分蒸散量と角層水分量を毎日測定したほか、上皮の剥がれを外観観察してスコア化し、評価した。
【結果】紫外線の照射量に関わらず、外観観察のスコアにおいて、食用ヘチマエキス投与によって上皮の剥がれに軽減がみられた。また、100 mJ/cm$^2$ の紫外線を照射した 2 群間で食用チマエキス投与による経皮水分蒸散量の有意な低下がみられた。
【結論】食用ヘチマエキスの経口摂取はドライスキンの原因となる水分蒸散量の上昇を抑制し、皮膚のバリア機能を改善した。このことから、食用ヘチマエキスには肌の水分を保持し、ドライスキンを緩和する食品としての可能性が期待できる。

dry skin, photoaging, hairless mice

講演番号：4A07a02
講演日時：3 月 20 日 09:35～ A 校舎 07 会場

# 食用ヘチマエキス中のフェノール性化合物の単離・構造決定

# Identification of phenolic components from the edible luffa extract

○梅原 将洋、柳江 高次、山本 貴之、野中 詩織、齋 政彦（森永製菓(株)）
○Masahiro UMEHARA, Koji YANAE, Takayuki YAMAMOTO, Shiori NONAKA, Masahiko SAI (Morinaga & Co., Ltd.)

【目的】ヘチマは熱帯アジアが原産のウリ科の植物である。あまり知られていないが、東南アジアや沖縄県では古くより未熟なヘチマを食用ヘチマとして食してきており、関東でも沖縄料理店などで見かけることができる。また、ヘチマより得られた「ヘチマ水」は保湿作用のある化粧水として古くから利用されてきており、我々は、食用ヘチマエキスの経口摂取によってドライシンドローム（乾燥症候群）の症状が改善されることを確認している。ヘチマ中の成分としてトリテルペンなどの報告はあるが、フェノール性化合物についての学術的な報告は少ない。そこで我々は食用ヘチマ中のドライシンドローム改善効果成分を探索する目的で、食用ヘチマ中のフェノール性化合物について単離・同定を試みた。
【方法】80%エタノール水で還流抽出した食用ヘチマエキスを Sepabeads SP 70、Wakogel FC-40 および ODS-HPLC により単離精製した。得られた化合物は MS および NMR 測定により構造決定した。
【結果】上記方法によって食用ヘチマエキスから 18 種のフェノール性化合物を単離精製した。このうち 3 種は標準品との比較からフェニルプロパノイド類の *trans*-カフェ酸、*trans*-*p*-クマル酸および *trans*-フェルラ酸であることがわかった。残りの 15 種類については、LC-MS および NMR による構造解析によって、上述の 3 種のフェニルプロパノイド類とグルコースとの結合位置が異なる配糖体であることがわかった。さらに、いずれのフェニルプロパノイド類においても 4 位および 6 位の配糖体に関しては、HPLC のクロマトグラフ上で異なる保持時間を示すα-、β-の平衡化合物であることがわかった。以上のことより、食用ヘチマエキス中の主要なフェノール性化合物はフェニルプロパノイド類の *trans*-カフェ酸、*trans*-*p*-クマル酸および *trans*-フェルラ酸およびそれらの配糖体であることを明らかとした。また、これら化合物の抗酸化活性を評価したので併せて報告する。

phenylpropanoid, luffa, dry syndrome

講演番号：4A07a03
講演日時：3 月 20 日 09:50～ A 校舎 07 会場

# 食用ヘチマエキス摂取時のラットにおける *p*-クマル酸の吸収

# The absorption of *p*-coumaric acid in rats after administration of the extract of luffa.

織谷 幸太、○瀬戸口 裕子、伊藤 良一、梅原 将洋、山本 貴之、柳江 高次、齋 政彦 (森永製菓(株))
Yukihiro ORITANI, ○Yuko SETOGUCHI, Ryouichi ITO, Masahiro UMEHARA, Takayuki YAMAMOTO, Koji YANAE, Masahiko SAI (Morinaga & Co., Ltd.)

【背景・目的】熱帯・亜熱帯地方において栽培される食用ヘチマの可食部のエキスは、経口摂取においてドライシンドロームを改善することが期待される健康素材である。これには様々なフェニルプロパノイド類が含有されており、その主要な化合物は *p*-クマル酸、カフェ酸、フェルラ酸およびそれらの配糖体である。しかし、食用ヘチマエキスを経口摂取したときのそれらの吸収は明らかになっていない。本研究では食用ヘチマエキスをラットに経口投与したときのフェニルプロパノイド類の吸収を明らかにすることを目的に実験を行った。さらに、食用ヘチマエキスに含有される主要なフェニルプロパノイドとして、グルコースとの結合位置の異なる 3 種類の *p*-クマル酸配糖体をそれぞれ単独で経口投与したときの吸収についても比較検討した。
【方法】頸静脈にカテーテルを留置した SD 雄性ラットに食用ヘチマエキスを経口投与し、投与後 8 時間まで経時的にカテーテルより血液を採取した。その後、血漿中のフェニルプロパノイド類の濃度を HPLC により測定した。さらに、食用ヘチマエキスより精製した *p*-クマル酸配糖体についても同様の実験を実施した。
【結果】食用ヘチマエキス投与後の血漿中にはフェニルプロパノイドのアグリコンとして *p*-クマル酸が主として検出された。これは、カフェ酸、フェルラ酸など食用ヘチマエキスに含まれる他のフェニルプロパノイドと比較して、*p*-クマル酸の吸収効率が高いことを示唆していた。次に、3 種類の *p*-クマル酸配糖体をそれぞれ投与した結果、*p*-クマル酸の最高血中濃度到達時間(Tmax)はそれぞれ異なることが明らかとなった。配糖体の大部分は一旦アグリコンに変換されて吸収されると考えられており、投与した *p*-クマル酸配糖体毎に異なる Tmax が得られたのは、配糖体からアグリコンへの変換効率がそれぞれ異なっていたためであると推察された。

phenylpropanoid, *p*-coumaric acid, absorption

講演番号：4A07a04
講演日時：3 月 20 日 10:05～ A 校舎 07 会場

# 食用ヘチマエキスの有効成分 *p*-クマル酸が細胞の水分透過性に与える影響

Effect of *p*-coumaric acid derived from the extract of luffa on dome formation in cultured canine kidney epithelial cell line (MDCK I).

○野中 詩織、山本 貴之、梅原 将洋、柳江 高次、齋 政彦 (森永製菓(株))
○Shiori NONAKA, Takayuki YAMAMOTO, Masahiro UMEHARA, Koji YANAE, Masahiko SAI (Morinaga & Co., Ltd.)

【目的・背景】 本大会において、食用ヘチマエキスは UV 照射ドライスキンモデルマウスにおいて皮膚での保湿効果があること、また、食用ヘチマエキスにはカフェ酸やフェルラ酸、*p*-クマル酸などのフェニルプロパノイド類やそれらの配糖体が含有されており、食用ヘチマエキスの経口投与により、アグリコンとして *p*-クマル酸が主要成分として血中に検出されることを報告した。本報告では、食用ヘチマエキスのドライシンドローム改善効果のメカニズム解明のため、イヌ腎由来細胞株である MDCK I 細胞のドーム形成能を利用した水分透過性評価モデルおよび同細胞での水チャネル（アクアポリン 3）の遺伝子発現変動について検討したので報告する。

【方法】MDCK I 細胞のドーム形成能を利用した水分透過性評価モデルとは、MDCK I 細胞をプレート上で培養すると単層シート状になり、刺激が加わることにより、細胞内外の塩や水分が透過し、顕微鏡下でドーム形成が確認できるようになる。このドーム形成のサイズや数を計測することによって食品成分などの水分透過や潤い効果を評価する当社独自のモデルである [1)]。具体的には、24well plate に MDCK I 細胞を播種し、単層を形成させ、食用ヘチマエキスに含まれる各種フェニルプロパノイド類を添加し、位相差顕微鏡により形成されたドーム数を計測した。また、同様に処理した MDCK I 細胞から mRNA を抽出し、アクアポリン 3 遺伝子の発現量を RT-PCR 法により定量した。

【結果】 検討したフェニルプロパノイド類の中で *p*-クマル酸アグリコンが顕著に MDCK I 細胞のドーム形成を促進した。また、MDCK I 細胞におけるアクアポリン 3 遺伝子の発現に関しても、*p*-クマル酸による刺激時間依存的および濃度依存的に上昇させていた。以上の結果から、食用ヘチマエキスの経口摂取によるドライシンドローム改善効果は、血中に吸収された *p*-クマル酸アグリコンによるアクアポリン 3 を介した水分透過性向上がメカニズムの一つであることを明らかとした。

[1)]特許 5544122（潤い効果の評価方法）

luffa, *p*-Coumaric acid, dome formation

講演番号：4A07a05
講演日時：3 月 20 日 10:20～ A 校舎 07 会場

# 食用ヘチマエキスの有効成分 *p*-クマル酸および *p*-クマル酸配糖体の安定性

# Stability of *p*-coumaric acid and its glucosides, active phytochemicals in edible luffa extract.

瀬戸口 裕子、梅原 将洋、織谷 幸太、○柳江 高次、齋 政彦（森永製菓株式会社）
Yuko SETOGUCHI, Masahiro UMEHARA, Yukihiro ORITANI, ○Koji YANAE, Masahiko SAI (Morinaga & Co., Ltd.)

【目的・背景】ドライシンドローム改善に有効な健康素材として開発された食用ヘチマエキスにはフェニルプロパノイド類が多く含まれる。その中でも、食用ヘチマエキスを経口投与したラットの血漿中に主要代謝物として検出され、ドライシンドローム改善効果が確認されたのが *p*-クマル酸である。食用ヘチマエキスには *p*-クマル酸、及びグルコースの 1，4，または 6 位が *p*-クマル酸に結合した 3 種類の *p*-クマル酸配糖体が含まれるが、いずれも血漿中に *p*-クマル酸として吸収されることを確認しており、食用ヘチマエキスを経口摂取した場合の有効成分であると推察している。健康素材開発においては有効成分の安定性を維持することが重要な課題の 1 つであるが、*p*-クマル酸配糖体の安定性についてはほとんど研究されていない。本研究では、*p*-クマル酸配糖体の光および pH に対する安定性を検討した。
【方法】*p*-クマル酸配糖体は、合成吸着剤、フラッシュカラムクロマトグラフィー、及び HPLC を用いて食用ヘチマエキスより精製した。光安定性試験では、*p*-クマル酸および *p*-クマル酸配糖体（100 μmol/L）を超純水に溶解し、強い蛍光灯の光を照射した。pH 安定性試験では、*p*-クマル酸および *p*-クマル酸配糖体（100 μmol/L）を薄めた McIlvaine 緩衝液（pH 2.2～8.0）に溶解し、80℃に加熱した。試験液中の *p*-クマル酸および *p*-クマル酸配糖体を HPLC で定量し、試験開始前に対する残存率を求めた。
【結果】光照射により、*p*-クマル酸および *p*-クマル酸配糖体は 50%以下まで減衰したが、光分解物との平衡関係が示唆された。pH 安定性については、*p*-クマル酸はいずれの pH においても概ね安定であったのに対し、*p*-クマル酸配糖体は pH5 以上では pH 依存的に減衰した。pH 8 では、いずれの *p*-クマル酸配糖体も加水分解によってアグリコン化したが、pH 5-7 付近ではグルコースに結合している *p*-クマル酸の転移が見られた。また、*p*-クマル酸 4 位および 6 位配糖体は pH 4 以下ではほぼ安定であったが、1 位配糖体は pH 4 よりも pH が低下するに従って減衰し、アグリコン化した。このように、*p*-クマル酸配糖体は、*p*-クマル酸とグルコースの結合部位の違いによって、pH に対して異なる挙動を示すことが明らかとなった。以上の結果より、pH を 4 付近に調整し、かつ遮光することによって、*p*-クマル酸および *p*-クマル酸配糖体の安定性を維持できることを明らかとした。

Luffa, *p*-Coumaric acid, Stability

講演番号：4A07a06
講演日時：3 月 20 日 10:35～ A 校舎 07 会場

# アロエステロール経口摂取によるヒト皮膚機能に及ぼす影響

# Effects of intake of *Aloe* sterol intake on the skin conditions

○鍋島 かずみ[1]、田中 美順[1]、三澤 江里子[1]、齊藤 万里江[1]、山内 恒治[1]、阿部 文明[1]、山本 有紀[2]、古川 福実[2]([1]森永乳業・素材応用研究所、[2]和歌山県立医科大・皮膚科)
○ Kazumi NABESHIMA[1], Miyuki TANAKA[1], Eriko MISAWA[1], Marie SAITO[1], Kouji YAMAUCHI[1], Humiaki ABE[1], Yuki YAMAMOTO[2], Fukumi FURUKAWA[2] ([1]Food Ingredients & Technology Institute, Morinaga Milk Industry Co.,Ltd., [2]Department of Dermatology Wakayama Medical University)

［背景・目的］皮膚の表皮は、水分の蒸散を防ぐとともに、有害な成分の侵入を防ぐバリア機能を有し、真皮は、線維芽細胞によって産生されるコラーゲン、エラスチン、ヒアルロン酸などによって、皮膚構造を維持している。このような表皮や真皮の働きによって、皮膚の健康が維持されているが、紫外線や乾燥などの外部環境や、生物学的な加齢にともなう線維芽細胞の減少や機能低下などにより、皮膚機能の低下や老化が引き起こされる。これまでに我々は、アロエステロール(シクロアルタノール化合物類及びロフェール化合物類として)がヒト皮膚線維芽細胞からのコラーゲン及びヒアルロン酸の産生を促進すること、経口摂取後に、吸収され血中に移行することを確認している。そこで今回、アロエステロールの経口摂取による皮膚機能の指標値の変化を検討するため、臨床試験を実施した。
［方法］成人の健常女性（試験１）あるいは、日常的に日光に暴露されている男性（試験２）を対象として、アロエステロール（40μg/日）摂取による皮膚機能の各指標について、二重盲検試験においてプラセボ対照群との群間比較を行った。恒温恒湿の状態（温度：21±1℃、湿度：50%±5%）に設定した測定室にて、安静な状態で 15 分馴化させた後に測定を実施した。経皮水分蒸散量(TEWL：transepidermal water loss）は Tewameter TM3008 を、皮膚粘弾性は、Cutometer MPA580 を、コラーゲンスコアは、DermaLab を用いて測定した。
［結果］アロエステロール摂取により、経皮水分蒸散量は低下し、皮膚水分量の増加が確認された。皮膚弾力性の指標は有意に増加した。また、日常的に紫外線に暴露されている男性においても、46 歳以下の部分解析で皮膚弾力性の指標の変化量（%）が有意に増加した。さらに、超音波機器を用いて真皮層の状態を調べた結果、アロエステロール摂取により対照群に比べ、コラーゲンスコアが有意に増加することが確認された。以上の結果から、アロエステロールには、皮膚バリア機能を高めて肌の潤い保つことや、真皮コラーゲン（スコア）を増やして肌の弾力を保つ機能があることが示唆された。

aloesterol, skin, clinical trial

発表責任者：田中　美順（m_tanaka@morinagamilk.co.jp）

講演番号：4A07a07
講演日時：3 月 20 日 11:00～ A 校舎 07 会場

# 青梅を利用した化粧水の美白効果と有効成分の分析

# Whitening effect of lotions using unripe ume and analysis of its active components

○本間 知夫[1]、深澤 穂乃美[1]、鈴木 真依[1]、望月 愛華[1]、金井 裕美[1]、地下 まゆみ[2]([1]前工大生物工学、[2]大阪大谷大教育)
○Tomoo HOMMA[1], Honomi Fukasawa[1], Mai Suzuki[1], Aika Mochizuki[1], Hiromi Kanai[1], Mayumi Jige[2] ([1]Maebashi Inst.Tech., [2]Osaka Ohtani Univ.)

【目的】当研究室では、和歌山県より美白効果があると謳われた青梅を使った自家製化粧水（以後、梅化粧水）の機能性評価を行う機会を得たこと、群馬県は梅生産量が全国第 2 位であるが最近落ち込みが危惧されていて群馬県産ウメのさらなる活用方法が求められていることから、群馬県産ウメを利用した梅化粧水等の開発とその美白効果を含む機能性評価について研究を進めている。本研究では、梅化粧水の元となる梅抽出液を準備するにあたって、品種や採取時期が美白効果に及ぼす影響、また美白効果を示す成分についての検討を行うことを目的として実施した。
【方法】（１）材料：群馬県高崎市箕郷町の梅農家より、3 品種（白加賀、南高梅、紅養老）の青梅果実を 6 月上旬から 10 日ごとに採取（年に依り異なる）し、それぞれ約 1kg の青梅果実をホワイトリカー1.8L（35%アルコール）に浸漬し、3 ヶ月後あるいは 5 ヶ月後に果実を取り出し、ろ過することで得た液を梅抽出液として使用した。自家製化粧水はこの梅抽出液を精製水と 5:4 の割合で混合して製造されていたので、本研究では蒸留水で 5:4 に希釈した液を梅希釈液として使用した。
（２）美白効果：美白効果はメラニン合成酵素であるチロシナーゼに対する活性の阻害の有無を調べ、阻害率を算出して評価した。なお、既存の美白成分としてよく利用されるコウジ酸を対照とした。
（３）美白効果成分の分析：梅抽出液について、１）熱処理（100℃、2 分間）、２）pH 調製（梅抽出液を中和する、リン酸緩衝液を梅抽出液の pH に合わせる、など）、３）有機酸の定量（中和滴定により総有機酸量を定量し、クエン酸量に換算した溶液を調製）、４）ゲル濾過分画（Sephadex LH-20 を用いたゲル濾過クロマトグラフィー（ゲル量 10.5mL、サンプル量 1.0mL、移動相 0.1M リン酸緩衝液）により梅抽出液の分画を実施）を実施した各液について美白効果を調べた。
【結果・考察】梅抽出液及び梅希釈液はいずれも高いチロシナーゼ阻害率（60～90%）を示した。熱処理や pH 調製によって阻害率は変化しなかった。梅抽出液中の酸濃度は約 0.15%で、この濃度のクエン酸溶液は美白効果を示さなかった。品種別では紅養老＞白加賀＞南高梅の順で、そして 6 月中旬～下旬に採取した青梅から得られた抽出液で美白効果が高く、美白効果成分は品種や成熟と関係があることが示唆された。また浸漬期間が長くなると美白効果が減少する傾向があった。梅抽出液のゲル濾過分画において、高いチロシナーゼ阻害率を示す画分の分子量は 140 前後であることが推察された。現在、美白効果成分の分析や梅抽出液の他の機能性について実験を進めているところである。
【謝辞】青梅果実を提供して下さった神澤農園・神澤文明氏に感謝致します。

whitening effect, Prunus mume, liquor

発表責任者：本間知夫（thomma@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：4A07a08
講演日時：3 月 20 日 11:15～ A 校舎 07 会場

# 卵黄由来ヒアルロン酸産生促進物質(iHA)の肌機能に対する効果

# The effect of the egg yolk-derived hyaluronic acid inducer (iHA) on skin functions

○井上 侑紀、中村 紀夫、堀江 健二、黄 英晴、金 武祚 ((株)ファーマフーズ)
○Yuki INOUE, Toshio NAKAMURA, Kenji HORIE, Hideharu KOH, Mujo KIM (Pharma Foods International Co., LTD.)

【目的】女性の美肌に関する関心は非常に高く、50 歳以上の女性の 90%以上が、保湿、肌の老化防止、シワ対策等の美肌効果を期待している（富士経済調べ 2016 年)。これは、加齢に伴い、肌真皮のヒアルロン酸が減少していく現象を示している。一方、高齢化に伴う関節障害への訴求から、我々は卵黄の酵素加水分解物より骨芽細胞におけるヒアルロン酸産生促進物質(iHA)を調製し、膝痛の改善に寄与する機能性食品素材を製品化するに至った。今回、膝痛改善素材であった iHA を肌機能の改善に応用する事を目的に、繊維芽細胞を用いた機能評価試験、及びヒト経口摂取試験によりその効果を確認した。
【方法】細胞による機能評価はヒト繊維芽細胞株を用いて実施した。培養培地中に iHA を添加し、細胞増殖能及びヒアルロン酸産生能を評価した。また、ヒト試験では健常な男女 15 名を募り、盲検並行群間試験を実施した。被験者を 2 群に割付けた。サンプル群(7 名 37.4 歳)は iHA を 200 mg/day、プラセボ群(8 名 37.2 歳)はデキストリンを 200 mg/day でそれぞれ摂取した。試験期間は 6 週間とし、肌機能に対する効果は視覚的評価(VAS)を用いた 8 項目(「肌の調子」、「肌の悩み」、「しわ」、「潤い」、「クマ」、「てかり」、「毛穴」、「にきび」)からなるアンケートにより評価した。
【結果】iHA は繊維芽細胞の増殖能を促進し、ヒアルロン酸産生能を増加させる効果を有した。一方、ヒト試験は、試験期間中自己都合により脱落した被験者 1 名を除外し、サンプル群 6 名及びプラセボ群 8 名により解析を実施した。サンプル摂取 6 週間後、8 項目の設問のうち、「肌の調子」、「肌の悩み」、「しわ」、「潤い」、「クマ」、「てかり」の 6 項目で有意な改善が認められ、プラセボ群では確認できなかった。増殖能の促進、ヒアルロン酸産生能の増加といった細胞試験における肌への効果が被験者の実感としても現れた事から、iHA は肌のハリや潤いを改善する、新しい肌の機能性素材として有効である事が示唆される。

skin function, hyaluronic acid, egg yolk

講演番号：4A07a09
講演日時：3 月 20 日 11:30～ A 校舎 07 会場

# 鶏足由来ヒアルロン酸産生促進物質の経口摂取による膝痛改善効果

# Oral administration of the chicken leg's hyaluronic acid inducer (HAS-II) improves knee pain of adult subjects with symptomatic knee osteoarthritis

○山下 裕輔、中村 紀夫、堀江 健二、金 武祚（(株)ファーマフーズ）
○ Yusuke YAMASHITA, Toshio NAKAMURA, Kenji HORIE, Mujo KIM (Pharma Foods International Co., LTD.)

【目的】現在、日本において 65 歳以上の人口は 3,000 万人を超え、その 3 人に 1 人は膝に痛みを感じていると言われる。また、膝関節症の患者数は 700 万人と推定されている。変形性膝関節症の治療は対処療法しかなく、効果的な治療薬が存在しない。我々は鶏足の酵素分解物から生理活性素材を探索し、細胞試験においてヒアルロン酸合成酵素(HAS2)の遺伝子発現を亢進する鶏足由来ヒアルロン酸産生促進物質(HAS-II)を見出し、ウサギを用いた動物試験において関節障害の改善を促す事を示した。本件ではヒト関節 QOL の改善効果を検証するべく、ヒト経口摂取試験を実施した。

【方法】膝関節に悩む男女 39 名を対象に二重盲検並行群間試験を実施した。被験者は変形性膝関節症患者機能評価尺度(JKOM)の値、年齢、体重、身長が可能な限り等しくなるように 3 群（各 13 名）に分けた。低用量群(49.8± 5.9 歳)は 50 mg/day、高用量群(49.3± 6.3 歳)は 200 mg/day でそれぞれ HAS-II を摂取し、プラセボ群(48.7± 5.7 歳)ではデキストリンを摂取した。試験期間は 12 週間とし、摂取前、6 週後及び 12 週後に JKOM 評価を実施し、HAS-II の膝 QOL 改善効果を検証した。

【結果】JKOM 評価は膝の痛みに対する視覚的評価(VAS)と 25 の質問からなる膝の状態や日常生活の困難度などへの質問で実施した。12 週後、HAS-II の両容量群でプラセボ群と比較して VAS が 6 mm 以上改善した。また、設問、「普段している事の困難さ」及び「しゃがみ込みや立ち上がりの困難さ」が HAS-II 摂取により改善した。試験終了後、開始時に対して膝状態が改善された被験者数を群間で比較したところ、「朝、起きて動き出す時の膝の痛み」はプラセボ群 5/12 名に対し、低用量群で 9/11 名、高用量群で 10/12 名と有意な増加($p < 0.05$)が認められた。また、「しゃがみ込みや立ち上がりの困難さ」においてもプラセボ群 4/12 名に対し、低用量群で 9/11 名、高用量群で 10/12 名と有意な増加($p < 0.05$)が認められた。

これらの結果は HAS-II の摂取が膝関節症の初期兆候である「初動痛」の緩和に特に有効である事を示唆し、広く膝関節痛の緩和及び予防に効果的な食品素材である事が示された。

chicken leg extract, knee pain, JKOM

講演番号：4A07a10
講演日時：3 月 20 日 11:45～ A 校舎 07 会場

# 女性を対象とした卵黄由来育毛素材の経口摂取試験

# The oral administration study of female subjects using egg yolk-derived hair growth peptide

○中村 紀夫[1]、山村 春男[2]、堀江 典子[1]、堀江 健二[1]、金 武祚[1]、板見 智[3] ([1](株)ファーマフーズ、[2](株)シャルレ、[3]大阪大学大学院医学系研究科　皮膚・毛髪再生医学寄附講座)
○Toshio NAKAMURA[1], Haruo YAMAMURA[2], Noriko HORIE[1], Kenji HORIE[1], Mujo KIM[1], Satoshi ITAMI[3] ([1]Pharma Foods International Co., LTD., [2]CHARLE CO., LTD., [3]Department of Regenerative Dermatology, Osaka University Graduate School of Medicine)

【目的】鶏卵からヒナは羽毛をまとって孵化する。このことから、卵黄には羽毛の成長を促す育毛成分が存在することを想起した。脱脂卵黄から種々酵素反応により各種ペプチドを調製し、得られたペプチド成分について育毛生理活性成分を細胞試験法で追究した。続いて、活性ペプチド画分 Hair Growth Peptide (HGP)を、育毛モデルマウスに経口摂取させたところ、育毛促進作用を示すことが見出された。マウス表皮組織切片の観察からヘアサイクルの成長期が促進されていることが示された。ヒトへの育毛作用の検証を目的として、薄毛に悩む 40～50 代の健常女性を対象とした育毛試験(pilot study)を実施したところ、HGP 摂取群では、4 週間後に硬毛頻度が有意に増加するという結果を得た。上記試験に基づいて今回、大規模なヒト試験を実施したのでここに報告する。

【方法】試験設計は二重盲検比較試験とし、合計 68 名(平均年齢 49 歳)の薄毛が気になる女性被験者を Savin female density scale (サビンスケール)*、年齢、体重、身長、BMI が等しくなるように無作為に 2 群に分けた。試験群は HGP を、プラセボ群はデキストリンをそれぞれ 250 mg/day の用量で 6 ヶ月間摂取した。摂取前、３ヶ月後及び 6 ヶ月後にサビンスケールを測定した。また、被験者の頭頂部の毛髪を 1 cm 四方に刈り、フォトトリコグラムにより毛直径、毛髪密度を計測した。ここでは、日本人女性の平均毛直径とされる 80 μm 以上の毛髪を硬毛、40 μm 以下の毛髪を軟毛、その中間を非硬毛とし、それぞれの頻度を解析した。さらに、Visual Analog Scale(VAS アンケート)を用いて、毛髪に関する被験者の体感を調査した。

【結果】HGP 摂取群では 6 ヶ月後にサビンスケールが 0.14 ポイント改善し、プラセボ群の 0.03 ポイントに対し、危険率 1%未満の有意差を持って効果を示した。HGP を 6 ヶ月間摂取することでサビンスケールが改善した被験者数は 19/34 名に達し、実に 56%の被験者に効果が認められた。毛刈りした計測部位において、硬毛頻度は 15%増加し、非硬毛頻度は 12.5%減少した。また、計測した全毛髪における毛直径について平均 5.7μm の増加が観察された。このような傾向はプラセボ群では観察されず、薄毛の改善は HGP 摂取に起因した生理現象であると示された。更に、6 ヶ月後の毛髪密度は HGP 摂取群で 88.2 本 / 0.57 $cm^2$ であり、プラセボ群の 79.5 本 / 0.57 $cm^2$ に対し危険率 5%未満の有意差を持って改善した。また、VAS アンケート「抜け毛が気になる」「薄毛が気になる」等の設問に対して、HGP 摂取による明瞭な体感が示された。本件の結果から HGP の経口摂取による育毛効果が示された。

＊Savin RC. Kalamazoo, MI: The Upjohn Company; 1994. Evaluating androgenetic alopecia in male and female patients

hair growth, egg yolk, Savin female density scale

発表責任者：中村　紀夫（t-nakamura@pharmafoods.co.jp）

講演番号：4A07a11
講演日時：3 月 20 日 12:00～ A 校舎 07 会場

タマネギ由来エクソソーム様ナノ粒子の基礎的分析
Basic analysis of onion-derived exosome-like nanoparticles.
○古庄 利菜[1]、山崎 水優[1]、高島 沙季[1]、花本 由輝[1]、園田 紘子[2]、池田 正浩[2]、亀井 一郎[3]、大島 達也[4]、山崎 有美[5]、西山 和夫[1]、山崎 正夫[1]([1]宮大・農・応生、[2]宮大・農・獣医、[3]宮大・農・森林、[4]宮大・工・環境応用、[5]宮大・地域)
○Rina FURUSHO[1], Miyu YAMASAKI[1], Saki TAKASHIMA[1], Yoshiki HANAMOTO[1], Hiroko SONODA[2], Masahiro IKEDA[2], Ichiro KAMEI[3], Tatsuya OHSHIMA[4], Yumi YAMASAKI[5], Kazuo NISHIYAMA[1], Masao YAMASAKI[1] ([1]University of Miyazaki,Faculty of Agriculture,Dept.of Biochemistry and Applied Biosciences, [2]University of Miyazaki,Faculty of Agriculture,Dept.of veterinary Sciences, [3]University of Miyazaki,Faculty of Agriculture,Dept.of Forest and Environmental Sciences, [4]University of Miyazaki,Faculty of Engineering,Dept.of Applied Chemistry, [5]University of Miyazaki,Faculty of Regional innovation)

【目的】エクソソームは脂質二重膜で構成される直径約 100 nm 程度の小胞で、動物においてはタンパク質、脂質および核酸を含んでおり、細胞間や個体間での情報伝達物質としての役割を持つ。植物中にもエクソソーム様ナノ粒子があることが近年明らかとなりつつあり、食事を通じて植物からヒトへ機能性を伝播することが期待される。本研究ではタマネギの生理機能におけるエクソソーム様ナノ粒子の関与を明らかとするため、その分離と成分分析を試みた。
【方法】タマネギを角切りにし、フードプロセッサーで粉砕し、果汁を搾った。果汁を 1,000 x g で 5 分遠心し、上清を果汁サンプルとした。また、1,000 x g 上清を 15 分、17,000 x g で超遠心し、ペレットを 17Ks とした。さらに残った上清を 1 時間、200,000 x g で超遠心し、ペレットを 200Ks とした。これらのサンプルを用いて動的光散乱法による粒子径測定、薄層クロマトグラフィーによる脂質分析、タンパク質および RNA の電気泳動、HPLC 測定によるケルセチン類の定量を行った。
【結果】タマネギ果汁からは超遠心法により微粒子を回収することができ、その平均粒子径は 17Ks で 288.10 nm、200Ks で 185.28 nm であった。また脂質分析により、17Ks、200Ks において様々なクラスの脂質の存在が確認できた。タンパク質電気泳動により 17Ks と 200Ks にはいずれもタンパク質の存在が確認でき、SDS-PAGE 電気泳動パターンから 17Ks、200Ks に濃縮されるバンドが認められた。17Ks と 200Ks にはいずれも RNA の存在が確認でき、RNA 電気泳動により分子サイズが 20~80 bp 程度の低分子 RNA の存在を確認できた。タマネギに豊富に含まれるポリフェノールであるケルセチンとその配糖体であるケルセチン-4'-グルコシド、ケルセチン-3',4'-グルコシドの HPLC 測定では 17Ks、200Ks いずれにおいても 3 種類のケルセチンのピークが確認され、果汁と 17Ks、200Ks ではそれらの比率が異なっていた。以上よりタマネギから分離した粒子はエクソソーム様であると考えられる。またケルセチン類が含まれていることから、タマネギのエクソソーム様ナノ粒子による抗肥満、抗炎症効果が期待される。

Onion, Exosome, Nanoparticle

発表責任者：山崎正夫（myamasaki@cc.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：4A07a12
講演日時：3 月 20 日 12:15～ A 校舎 07 会場

# 食用植物由来エクソソーム様ナノ粒子のヒト乳がん抑制作用

# Suppressive Effect on the Growth of Human Breast Cancer MCF-7 Cells by Edible Plant Derived Exosome-like Nanoparticles.

○山崎 有美[1]、亀井 一郎[2]、大島 達也[3]、池田 正浩[4]、園田 紘子[4]、山崎 正夫[5] ([1]宮大地域、[2]宮大農・森林、[3]宮大工・環境応用、[4]宮大農・獣医、[5]宮大農・応生)
○Yumi YAMASAKI[1], Ichiro KAMEI[2], Tatsuya OSHIMA[3], Masahiro IKEDA[4], Hiroko SONODA[4], Masao YAMASAKI[5] ([1]Department of Regional Innovation, Univ. of Miyazaki, [2]Department of Forest and Environmental Sciences, Univ. of Miyazaki, [3]Department of Applied Chemistry, Univ. of Miyazaki, [4]Department of Veterinary Sciences, Univ. of Miyazaki, [5]Department of Biochemistry and Applied Biosciences, Univ. of Miyazaki)

【目的】近年、野菜や果実などの植物性食品に含まれるエクソソーム様のナノ粒子(Edible Plant Derived Exosome-like Nanoparticles;EPDENs)という新たな因子が注目されている。EPDENs は、50～1000nm 程度の脂質二重膜を持つ微粒子で、マイクロ RNA やタンパク質、ポリフェノールなどの物質を包含し、植物体内において情報伝達を司るエクソソーム様機能を有することが知られている。EPDENs は、細胞内に取り込まれることで生体調節機能を発現するとの報告があることから（Michel, Mol. Ther., 2013)、EPDENs の含有物であるポリフェノール類等は細胞内へ移行すると考えられる。これまでに、植物由来のポリフェノール類が、細胞内で乳がん抑制効果を発現することが報告されていることから(Chin ら,Cell Res., 2016)、乳がん抑制因子であるポリフェノールを含有する EPDENs は、乳がん抑制効果を示す可能性がある。本研究では、種々の食用植物より EPDENs を分離し、乳がん抑制作用について評価した。
【方法】本研究では、EPDENs を分離する食品素材として、ダイコン、シイタケ、ユズ、タマネギ、ヒュウガナツの 5 種類を用いた。ダイコン、タマネギは、サンプルをワーリングブレンダーに供し破砕後、シイタケは、リン酸緩衝液を 2 倍量加えワーリングブレンダーに供し破砕後、ユズ、ヒュウナガナツは、果実搾り器を用いて搾汁後、ガーゼを用いてろ過し搾汁を取得した。取得した搾汁を用いて、超遠心法により EPDENs サンプルを分離した。当該手法にて分離した EPDENs サンプルをヒト乳がん細胞株 MCF-7 に供し、細胞増殖/毒性を測定した。
【結果】最初に、EPDENs を分離するための超遠心法の条件を検討した。その結果、4℃、3,000 x g で 20 分遠心し上清を回収後、4℃、20,000 x g で 20 分遠心し上清を回収、更に、4℃、200,000 x g で 80 分遠心することで、上記 5 種類の食用植物より EPDENs を分離することができた。5 種類の食品より分離した EPDENs をヒト乳がん細胞株 MCF に処理した結果、2 種類の食品由来機能性微粒子において乳がん抑制作用が認められることが明らかとなった。本研究成果を踏まえて、今後、他の食材にも微粒子が含まれているかどうか、さらに、微粒子の乳がん抑制作用等の生体調節機能に与える影響についての検討を進めて行く予定である。

Exosome, Edible Plant, Breast Cancer

発表責任者：山崎有美（yamasakiy@cc.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：4A08a01
講演日時：3 月 20 日 09:20～ A 校舎 08 会場

クルクミンによる褐色脂肪細胞化の誘導とその機序解明
Induction of brown-like adipocyte formation by curcumin and its mechanism
○西川 翔[1]、神谷 美沙[1]、青山 広樹[1]、野村 真美[1]、高橋 司[2]、今泉 厚[2]、津田 孝範[1] ([1]中部大・応生、[2](株)セラバリューズ)
○ Sho NISHIKAWA[1], Misa KAMIYA[1], Hiroki AOYAMA[1], Mami NOMURA[1], Tsukasa TAKAHASHI[2], Atsushi IMAIZUMI[2], Takanori TSUDA[1] ([1]Chubu Univ., [2]THERAVALUES Corp.)

【目的】 哺乳動物には 2 つの脂肪組織（白色脂肪組織、褐色脂肪組織）があることが知られている。白色脂肪組織がエネルギー貯蔵器官であるのに対し、褐色脂肪組織は体熱産生を行い、エネルギー消費を促進する。近年の研究から寒冷刺激などの環境条件により、白色脂肪組織中で「誘導型」褐色脂肪細胞が増加（褐色脂肪細胞化）し、熱産生によるエネルギー消費が増加し体脂肪が減少することが明らかになった。このような背景から演者らは、褐色脂肪細胞化を誘導する食品由来因子の検討を行っている[1)]。本研究では、香辛料ターメリックに含まれる黄色色素クルクミンによる褐色脂肪細胞化の誘導とその機序を明らかにすることを目的とした。

【方法】 C57BL/6J マウスにクルクミンを 4 週間経口投与し、鼠蹊部白色脂肪組織、精巣上体白色脂肪組織、肩甲骨間褐色脂肪組織を採取した。褐色脂肪細胞化に伴う形態変化を HE 染色で観察し、褐色脂肪細胞化マーカーである UCP1 タンパク質発現をウェスタンブロッティング及び免疫染色により検討した。

【結果】 クルクミンを経口投与したマウスにおいては、鼠蹊部白色脂肪組織に褐色脂肪細胞化で観察される多房化形成や UCP1 陽性の細胞が認められ、UCP1 タンパク質の発現量は有意に上昇した。一方、精巣上体白色脂肪組織、肩甲骨間褐色脂肪組織においては明確な誘導は認められなかった。次にクルクミンによる褐色脂肪細胞化誘導の作用機序の解明を試みた。その結果、免疫担当細胞の関与が示唆されたので、現在さらに C3H10T1/2 細胞や動物個体を用いて詳細な解析を進めている。

1） *PLoS ONE* (2016) 11: e0162512.

Curcumin, Browning, UCP1

講演番号：4A08a02
講演日時：3 月 20 日 09:35～ A 校舎 08 会場

プロポリス成分による褐色脂肪細胞化の誘導と作用機構の解明
Induction of brown-like adipocytes formation by propolis-derived component and its molecular mechanism
○青山 広樹[1]、西川 翔[1]、神谷 美沙[1]、吉村 一輝[2]、熊澤 茂則[2]、津田 孝範[1] ([1]中部大応生、[2]静岡県大食品栄養)
○Hiroki AOYAMA[1], Sho NISHIKAWA[1], Misa KAMIYA[1], Kazuki YOSHIMURA[2], Shigenori KUMAZAWA[2], Takanori TSUDA[1] ([1]Chubu Univ., [2]Univ. of Shizuoka)

【目的】
白色脂肪組織がエネルギー貯蔵器官であるのに対し、褐色脂肪組織は熱産生を行い、エネルギー消費を促進する。近年の研究から環境条件により、白色脂肪組織中で「誘導型」褐色脂肪細胞が増加（褐色脂肪細胞化）し、熱産生によりエネルギー消費を促進して体脂肪が減少することが明らかにされている。このような背景を踏まえて本研究では、食品由来因子としてブラジル産プロポリスに含まれる Artepillin C（ArtC）による褐色脂肪細胞化誘導とその機構を明らかにすることを目的とした。

【方法】
マウス由来 C3H10T1/2 細胞株及びマウス皮下白色脂肪組織より得た stromal vascular fraction を用いた初代培養細胞系を用いた。ArtC の投与による褐色脂肪細胞化誘導と機構解明のため、熱産生タンパク質である UCP1 など褐色脂肪細胞化マーカーの発現量及び褐色脂肪細胞化に関わる転写調節因子 PRDM16 のタンパク質発現量を測定した。さらに、C57BL/6J マウスに 4 週間 ArtC の経口投与を行い、各脂肪組織の形態学的変化や UCP1 の発現を免疫組織染色とウエスタンブロッティングにより検討した。

【結果】
ArtC の投与により C3H10T1/2 細胞及び初代培養細胞系のいずれにおいても、UCP1 をはじめとする褐色脂肪細胞化マーカーの mRNA 発現が有意に増加した。この上昇には濃度依存性が認められ、UCP1 タンパク質の発現量も同様な上昇が認められた。ArtC による褐色脂肪細胞化の誘導機構は、ArtC が PPARγのアゴニストとして作用し、PRDM16 タンパク質の分解を抑制することで褐色脂肪細胞化を促すと考えられた。C57BL/6J マウスに ArtC を 4 週間経口投与すると、鼠蹊部白色脂肪組織に褐色脂肪細胞化で観察される多房化形成や UCP1 陽性の細胞が認められ、UCP1 タンパク質の発現量は有意に上昇した[1)]。現在 ArtC による体熱産生・エネルギー消費の上昇の検討を進めている。

1) *PLoS ONE* (2016) 11: e0162512.

propolis, Brown-like adipocytes, UCP1

講演番号：4A08a03
講演日時：3 月 20 日 09:50～ A 校舎 08 会場

EPA が脂肪組織における UCP1 発現誘導に及ぼす影響
The effects of EPA on the induction of UCP1 in adipose tissue.
○谷川 貴之[1]、KIM Minji[1]、後藤 剛[1,2]、河田 照雄[1,2]（[1]京大院農・食品生物、[2]京大・生理化学研究ユニット）
○Takayuki TANIGAWA[1], Minji KIM[1], Tsuyoshi GOTO[1,2], Teruo KAWADA[1,2] ([1]Div. Food Sci. Biotechnol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Res. Unit Physiol. Chem., Kyoto Univ.)

【目的】
ヒトには、エネルギーを貯蔵する白色脂肪組織（White Adipose Tissue, WAT）とエネルギーを消費する褐色脂肪組織（Brown Adipose Tissue, BAT）の 2 種類の脂肪組織が存在する。特に、BAT ではミトコンドリア内膜上に脱共役タンパク質 1 (uncoupling protein 1, UCP1）が特異的に発現しており、電子伝達系によって得られた $H^+$濃度勾配を ATP 合成に用いることなく熱を産生することで高い熱産生能を有し、全身のエネルギー代謝調節に寄与している。従って、UCP1 の発現を亢進することが肥満や肥満関連疾患の予防・改善に有効であると考えられる。先行研究により、魚油摂取が肩甲骨間褐色脂肪組織 (interscapular BAT, iBAT）および鼠径部白色脂肪組織（inguinal WAT, iWAT）において、交感神経活性化により UCP1 の発現を誘導し、エネルギー消費を亢進させることを明らかにした。本研究は、魚油の主な構成脂肪酸であるエイコサペンタエン酸（EPA）が交感神経の活性化を介した脂肪組織における UCP1 の発現誘導に及ぼす影響を調べることを目的とした。
【方法・結果】
C57BL/6 雄性マウスに EPA のエチルエステル体（EPA-E）を経口的に単回投与し、EPA-E 投与後 24 時間目までの経時的な iBAT および iWAT の *Ucp1* mRNA 発現量を測定した。その結果、単回の EPA-E 投与により、iBAT と iWAT の *Ucp1* mRNA 発現量が有意に増加することが明らかになった。さらに、EPA-E 投与後 2 時間および 4 時間の酸素消費量を測定したところ、EPA-E 投与により酸素消費量は速やかに増加した。以上より、EPA-E 投与は iBAT および iWAT において速やかに UCP1 発現を誘導し、エネルギー消費を増加させることが示された。さらに、β アドレナリン受容体遮断薬である propranolol を前投与し、EPA-E の投与を行ったところ、EPA-E 投与による UCP1 発現誘導は認められなくなった。
【考察】
EPA-E投与は、交感神経の活性化とβ受容体を介した脂肪組織のUCP1発現誘導により、エネルギー消費を速やかに亢進させることが示唆された。

fish oil, sympathetic nervous system, thermogenesis

講演番号：4A08a04
講演日時：3 月 20 日 10:05～ A 校舎 08 会場

# アシタバカルコンは AMPK 経路を介して成熟白色脂肪細胞のベージュ化を促進する

# Xanthoangelol promoted browning of white adipocytes through AMPK signaling pathway

○劉 軼韻[1]、山本 憲郎[2]、山下 陽子[1]、芦田 均[1] ([1]神戸大農、[2]ハウスウェルネスフーズ株式会社)
○Yiyun LIU[1], Norio Yamamoto[2], Yoko Yamashita[1], Hitoshi Ashida[1] ([1]Kobe Univ., [2]HOUSE WELLNESS FOODS Co.)

【背景と目的】白色脂肪細胞はエネルギー源となる脂肪の蓄積と生理活性物質の分泌を担い、褐色脂肪細胞は体温調節に向けた熱産生のために脂肪を分解してエネルギーを消費する。最近、白色脂肪細胞や褐色脂肪細胞と異なる独自の遺伝子発現パターンを示し、寒冷刺激や食品因子等により UCP-1 を高発現し、褐色脂肪細胞と同様に熱産生を行うベージュ細胞が見い出された。カルコンはポリフェノールの一種であり、抗炎症、抗糖尿病、抗酸化作用などを有することが報告されている。また、われわれはアシタバ由来のカルコン類が前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化を抑制するとともに分化過程の脂肪細胞における脂質蓄積量を抑制することを明らかにしている。しかしながら、アシタバカルコン類による成熟白色脂肪細胞から褐色脂肪様のベージュ化を促進する効果については明らかとなっていない。そこで本研究では、この作用を解明することを目的とした。
【方法】マウス線維芽細胞 3T3-L1 細胞を分化誘導剤で 8 日間処理することで成熟脂肪細胞に分化させた。成熟脂肪細胞にアシタバ由来カルコンの 4-hydroxyderricin と xanthoangelol を 0.1、1、10 μM で 24 時間作用させた際、ベージュ化のマーカータンパク質（UCP1、PGC1α、PRDM16、Sirt1、リン酸化 AMPK）のタンパク質の発現量を測定した。また、SudanII 染色により成熟脂肪細胞における脂質蓄積量の変化を評価した。
【結果と考察】アシタバカルコン類 4HD と XAG により、成熟脂肪細胞における脂質蓄積量は濃度依存的に減少した。アシタバカルコン類 4HD と XAG は AMPK のリン酸化を濃度依存的に上昇させた。さらに、AMPK 下流因子である脂肪酸酸化酵素 CPT1A と脱共役タンパク質 UCP2 の発現量も有意な上昇が認められた。特に、xanthoangelol は、ベージュ脂肪細胞のマーカータンパク質 UCP1 と PGC1α の発現量を濃度依存的に促進させた。また、10 μM で細胞に作用させた際、UCP1 の上流を制御する転写因子 PRDM16 と脱アセチル化酵素 SIRT1 の発現量も有意な上昇が見られた。以上の結果より、アシタバカルコン、特に xanthoangelol は、白色脂肪細胞のベージュ化および脂質分解を促進することで脂質蓄積量を抑制し、抗肥満効果を有することが示唆された。

chalcone, lipolysis, 3T3-L1

講演番号：4A08a05
講演日時：3 月 20 日 10:20～ A 校舎 08 会場

# ウメポリフェノールとその体内代謝物であるヒドロキシ桂皮酸類の高脂肪食誘導性肥満マウスにおける糖尿病予防効果

# Diabetes preventive effect of polyphenols from plum vinegar and its metabolites, hydroxycinnamic acids, in high fat diet-induced obese mice

○永井 宏平、伊谷 強、東山 瑞季、木下 晃、尾上 裕太郎、向 秀智、山路 真由、淡路 智貴、大世渡 勇紀、阪上 綾花（近大生物理工）
○ Kouhei NAGAI, Tsuyoshi Itani, Mizuki Higashiyama, Akira Kinoshita, Yutaro Onoue, Hidetomo Mukai, Mayu Yamaji, Tomoki Awaji, Yuki Oosedo, Ayaka Sakaue (Kindai Univ.)

【目的】近年、脂肪を過剰に蓄積した脂肪組織においてマクロファージ細胞が起こす慢性炎症が生活習慣病の進展に関与することが明らかとなってきた。したがって、抗炎症成分の摂取による生活習慣病の予防が期待されている。近年、我々は、梅干しの製造過程で生じる梅酢から精製されたポリフェノール画分（UP）と、その体内代謝物であるヒドロキシ桂皮酸類に、マクロファージ細胞の活性化を抑制する効果があることを示した。そこで、本研究では、UP とヒドロキシ桂皮酸類に糖尿病予防効果があるかを、高脂肪食により肥満誘導したマウスを用いて解析した。
【方法】6 週齢の C57BL/6J Kwl 雄マウスに、高脂肪食（HFD-60, オリエンタル酵母）を 5 週間摂取させ、肥満を誘導した。UP 摂取群には 1.0 %の UP を混餌摂取させた。ヒドロキシ桂皮酸添加群としては、UP 中の含有濃度を考慮して、0.02% trans-p-クマル酸群、0.011% フェルラ酸群、0.011%カフェ酸群、そして 3 種類を全て添加した群を設定した（各群 n=5-6）。各群の摂取カロリーはセルロースの添加によって調整した。また、高脂肪食のみ（HD 群）、通常食のみ（ND 群）を摂取させた対照群も設置した。試験最終日に 16 時間の絶食を行い、空腹時血糖値と空腹時血中インスリン濃度を測定した。また、両値より算出される HOMA-IR 値によってインスリン抵抗性を評価した。
【結果と考察】5 週目における体重の増加量は、高脂肪食群に比べて、UP 摂取群、ヒドロキシ桂皮酸類摂取群において有意な差を示さない、もしくは有意に増加するという結果が得られた。それに対して、ND 群、HD 群、1%UP 群の空腹時血糖値はそれぞれ 104±12, 137±20, 101±9 mg/dL、HOMA-IR 値はそれぞれ 1.7±0.7, 2.8±1.3, 1.7±0.3 となり、1% UP の摂取によって、空腹時血糖と HOMA-IR 値は HD 群に比べて有意に低くなり（$P<0.01$, $P<0.05$）、ND 群と同程度の値にまで抑えられた。ここから UP に高脂肪食摂取によるインスリン抵抗性の進行を抑制する効果が存在することが示された。ヒドロキシ桂皮酸類添加群では、カフェ酸とクマル酸添加群では、HD 群と比べて、空腹時血糖値の有意な低下は見られたものの、HOMA-IR 値に有意な差は見られなかった。それに対し、フェルラ酸低下群では、空腹時血糖値が 87±27 mg/dL, HOMA-IR 値が 1.1±0.3 と、HD 群に比べて有意に低い値を示した。更に、3 種類のヒドロキシ桂皮酸類を混合摂取させた群では、空腹時血糖値が 74±34 mg/dL, HOMA-IR 値が 0.22±0.11 となり、フェルラ酸単独摂取よりも両値を低下させた、以上の結果から、UP が腸内で消化され体内に吸収されたヒドロキシ桂皮酸類が協奏的に働いてインスリン抵抗性の進行を予防していると考えられた。

polyphenol, hydroxycinnamic acid, diabetes

発表責任者：永井 宏平（knagai@waka.kindai.ac.jp）

講演番号：4A08a06
講演日時：3 月 20 日 10:35～ A 校舎 08 会場

ナツメグ抽出物による糖取り込み促進効果について
Effect of Nutmeg extract on promotion glucose uptake in L6 myotubes
○河野 龍之進[1]、前田 歩海[1]、吉岡 奏淳[2]、池田 真規[1]、山下 陽子[1]、芦田 均[1] ([1]神大農、[2]神大科学技術イノベーション研究科)
○Ryunoshin KONO[1], Ayumi Maeda[1], Yasukiyo Yoshioka[2], Masaki Ikeda[1], Yoko Yamashita[1], Hitoshi Ashida[1] ([1]Grad Sch.of Agri Sci Kobe Univ., [2]Grad Sch of Sci,Tech,and Innov Kobe Univ.)

[目的]
生体内の血糖調節において筋肉は重要な組織であり、細胞内小胞にある糖輸送担体 4 型(GLUT4)が細胞膜に移行することで、糖を細胞内に輸送し血糖の調節を行っている。香辛料は古くから調味料として用いられるだけでなく生薬としても用いられている。中でもナツメグは、抗炎症作用や抗酸化作用などが報告されているが、糖取り込みに及ぼす効果についてはまだ十分に明らかになっていない。本研究では、骨格筋細胞において GLUT4 の細胞膜移行を介した糖取り込み促進に寄与する香辛料の探索を行い、ナツメグに効果が認められた。そこでナツメグ中の有効成分について検討した。
[方法]
ラット骨格筋由来 L6 筋管細胞に、香辛料 24 種の熱水抽出物、90%エタノール抽出物および熱水抽出後の残渣を 90%エタノールで抽出した物(以下、熱水エタ抽出物)の各 3 種類を 0.1、1.0、10 μg/ml の濃度で作用させ、酵素法によって細胞内への糖取り込み量を測定した。糖取り込み促進効果が認められた抽出物のうちナツメグに着目し、熱水エタ抽出物をヘキサン、クロロホルム、酢酸エチルで溶媒分配した。各ナツメグ抽出物画分の糖取り込み量を、前述と同法により評価した。次にこれらの画分を HPLC を用いて分析し、有効成分の同定を試みた。また、有効成分についても、標品を L6 筋管細胞に作用させて糖取り込み促進効果を検証した。
[結果]
香辛料 24 種の糖取り込みスクリーニングの結果、ナツメグのエタノール抽出物と熱水エタ抽出物で濃度依存的に糖取り込み促進効果を見出した。これらの抽出物は 10 μg/ml 以上で有意な結果を示した。次に、熱水エタ抽出物の溶媒分配した画分で評価したところ、ヘキサン画分において、10 μg/ml の作用濃度で有意な糖取り込み上昇が見られた。HPLC によってヘキサン画分を分析したところ、画分中の成分が myristicin と 4-allyl-2,6-dimethoxyphenol のリテンションタイム及び UV スペクトルデータと一致した。さらに、myristicin 9 μg/ml、4-allyl-2,6-dimethoxyphenol 3 μg/ml でも糖取り込み促進効果を有していることが明らかとなった。以上の結果から、ナツメグの熱水エタ抽出物は糖取り込み促進効果を有し、そのヘキサン画分中には糖取り込み促進効果を有する myristicin と 4-allyl-2,6-dimethoxyphenol が含まれていることが明らかとなった。現在、これらの化合物による糖取り込み促進効果の作用機序を解明中である。

glucose uptake, Nutmeg, muscle

講演番号：4A08a07
講演日時：3 月 20 日 11:00～ A 校舎 08 会場

テアフラビンの経口摂取による体組成およびエネルギー消費への影響
Effect of oral theaflavin administration on body composition and energy consumption
○相澤 光輝[1]、山本 采佳[1]、上野 友哉[1]、松田 秀喜[1]、菊地 実奈子[2]、佐久間 理英[2]、新井 英一[2] ([1]焼津水産化学工業株式会社、[2]静岡県立大学)
○ Teruki AIZAWA[1], Ayaka YAMAMOTO[1], Tomoya UENO[1], Hideki MATSUDA[1], Minako KIKUCHI[2], Rie SAKUMA[2], Hidekazu ARAI[2] ([1]Yaizu Suisankagaku Industry Co.,Ltd., [2]University of Shizuoka)

【背景および目的】
テアフラビン類は紅茶に多く含まれる赤色色素であり、2分子のカテキン類が酸化縮合することによって生成するポリフェノールの一種である。これまでに、紅茶摂取によるLDLコレステロール値の低下作用や紅茶消費量とBMI値との相関関係などの報告はあるが、テアフラビンに着目したメタボリックシンドローム関連の臨床試験報告は少ない。本試験では、ヒトにおけるテアフラビンの経口摂取による機能性評価を目的として、体組成、エネルギー消費および自律神経への影響を測定評価した。
【方法】
①成人男女 28 名（平均年齢 37.7±3.4 歳、平均 BMI 24.2±1.2 kg/m$^2$）を対象として無作為化二重盲検並行群間試験を実施した。試験群はプラセボ群、テアフラビン低用量群（50 mg/day)、テアフラビン高用量群（100 mg/day)、カテキン群（400 mg/day）の 4 群として、各設定用量の半量を配合したカプセルを 1 日 2 錠摂取させ、摂取開始時、2、4、6、8 および 10 週目における体重、体脂肪率、皮下脂肪率、骨格筋率の 4 項目を体組成計により測定評価した。
②成人男女 14 名を対象として二重盲検クロスオーバー試験を実施した。テアフラビン 100 mg 配合カプセルの摂取前から摂取後 2 時間までの呼気ガスを測定し、エネルギー代謝評価を行った。
③成人男女 14 名を対象として二重盲検クロスオーバー試験を実施した。テアフラビン 100 mg 配合カプセルの摂前から摂取後 2 時間までの脈波を測定し、自律神経活動の評価を行った。
【結果】
①皮下脂肪率についてはテアフラビン低用量、高用量群共に摂取 8 週、10 週目でプラセボ群と比較して有意な減少が認められた。また、低用量群においては 8 週目の体脂肪率で有意な減少が認められ、さらに 6 週目の骨格筋率で有意な増加が認められた。体重については、テアフラビン高用量群において摂取 2 週目以降に減少傾向が確認されたものの、プラセボ群との有意差は認められなかった。
②テアフラビン群における有意なエネルギー代謝亢進は確認されなかった。
③テアフラビン群における交感神経活動の亢進が認められた。
以上の結果よりテアフラビンの経口摂取は、体脂肪率を減少させることで体組成の改善効果を有することが示唆された。さらに、体脂肪率の低下にはテアフラビン摂取による交感神経活動の亢進作用の関与が示唆された。

theaflavin, black tea, energy metabolism

講演番号：4A08a08
講演日時：3 月 20 日 11:15～ A 校舎 08 会場

朝食欠食モデルラットに高脂肪食を与えた場合の体脂肪および肝臓代謝リズムの変動
Breakfast skipping increased body weight and induced a delay of hepatic circadian rhythm in rats fed a high fat diet

○清水 初実[1]、半澤 史聡[2]、金 多恩[1]、孫 淑敏[1]、梅木 美樹[3]、望月 聡[3]、池田 彩子[2]、小田 裕昭[1]（[1]名大院生命農、[2]名古屋学芸大管理栄養、[3]大分大教育）
○Hatsumi SHIMIZU[1], Fumiaki HANZAWA[2], Da Eun KIM[1], Shumin SUN[1], Miki UMEKI[3], Satoshi MOCHIZUKI[3], Saiko IKEDA[2], Hiroaki ODA[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Nagoya Univ. Arts. Sci., [3]Oita Univ.)

【目的】近年、メタボリックシンドロームや生活習慣病患者が増加している。その要因の一つとして、食生活の乱れが考えられる。食事のタイミングは末梢組織の概日時計の形成に重要であり、演者らはラットに「ダラダラ食い」という昼夜問わずに摂取させ摂食タイミングを乱した食餌をさせることで、血中コレステロール濃度が増加することを報告してきた[1)]。この時の肝臓の時計遺伝子のリズムには異常が生じ、CYP7A1 遺伝子発現のリズムの前進が見られた。今回は、ヒトにおいて起こり得る食生活の乱れの例として、朝食欠食を取り上げた。以前演者らは、朝食欠食群モデルラットを考案し高コレステロール食を与えた時、肝臓の脂質代謝関連遺伝子のリズムが朝食欠食群で位相が後退することを報告した[2)]。本研究では、日本人の食の西洋化に注目し、朝食欠食群モデルラットに高脂肪食を与え、肝臓の概日時計や脂質代謝に異常が生じるか、また体温の概日リズムに与える影響を比較検討した。
【方法】5 週齢 Wistar 系雄性ラットを明期 8:00-20:00 の動物室にて飼育した。実験食は Lard を 15%、Corn Oil を 2%含む高脂肪食とした。食餌を暗期 20:00-8:00 に与える対照群と、4 時間遅らせて 0:00-12:00 に与える朝食欠食群を設けた。14 日間の飼育後、4 時間おきに屠殺し血清、肝臓、および精巣上体脂肪を得た。血清コルチコステロンとインスリン濃度を測定した。肝臓は、全 RNA を抽出し、遺伝子発現のリズムを解析した。体温は、埋め込み型体温計で計測をした。
【結果】体重は、朝食欠食群で有意に増加していた。これは、腎周囲脂肪などの脂肪重量増加によるものであった。体温は、対照群では活動期に上昇し、休息期に低下するが、朝食欠食群では体温の上昇は活動期から 4 時間も遅れ、低下は休息期から 1 時間のみ遅れていた。血清コルチコステロン濃度は変化が見られなかったが、インスリン濃度は朝食欠食群でピークの後退が見られた。一部の脂質代謝関連遺伝子では、高脂肪食によって位相が前進していた。以前の高コレステロール食を用いた朝食欠食では、肝臓時計遺伝子のリズムは朝食欠食群で大きな変動は見られなかったにもかかわらず、肝臓の脂質代謝関連遺伝子の位相は朝食欠食群で後退していた[2)]。一方、今回の高脂肪食を用いた朝食欠食では、時計遺伝子、脂質代謝関連遺伝子共に朝食欠食群で位相の後退が見られた。以上の結果から、高脂肪食を用いた朝食欠食は脳の体温中枢や肝臓の時計遺伝子、脂質代謝関連遺伝子のリズムを後退させることが明らかとなり、これが代謝リズムの異常を誘導し、体重増加さらにはメタボリックシンドロームにつながることが示唆された。

1）Circ. Res. 105, 545 (2009)　2）第 70 回　日本栄養・食糧学会　(2016)

Breakfast skipping, Circadian rhythm, Lipid metabolism

発表責任者：小田裕昭（hirooda@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：4A08a09
講演日時：3 月 20 日 11:30～ A 校舎 08 会場

*Euglena gracilis* Z 及び貯蔵多糖パラミロンの肝臓線維化抑制効果
Anti-fibrotic activity of Euglena gracilis and paramylon in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis
○中島 綾香[1]、白方 有香[2]、橋口 太志[2]、吉田 主税[2]、鈴木 健吾[1]、中野 長久[3]([1]株式会社ユーグレナ、[2]SMC ラボラトリーズ株式会社、[3]大阪府立大学大学院生命環境科学研究科)
○Ayaka NAKASHIMA[1], Yuka SHIRAKATA[2], Taishi HASHIGUCHI[2], Chikara YOSHIDA[2], Kengo SUZUKI[1], Yoshihisa NAKANO[3] ([1]euglena Co., Ltd, [2]SMC Laboratories, Inc., [3]Osaka Prefecture University)

【背景】
非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)は、脂肪肝から生じる炎症性疾患であり、線維化、肝硬変、肝がんへと進展する。治療方法は確立されていないが、いくつかの臨床試験が行われており、これまでに FXR agonist 等が有効であることが示されつつある。
ユーグレナは、微細藻類に分類される単細胞の微生物である。植物と動物両方の性質を兼ね備えていることから、ビタミン、ミネラル、アミノ酸、脂肪酸等多様な栄養素を含んでおり、栄養補助食品やサプリメントとして活用されている。また、ユーグレナの貯蔵多糖、パラミロンは、生活習慣病や免疫機能亢進などさまざまな効果があるとされているβグルカンの一種である。これまでに、ユーグレナ摂取による大腸がんや血糖値の改善、パラミロン摂取によるアトピー性皮膚炎の症状緩和や四塩化炭素で起こした肝炎の症状緩和などが各種動物試験により明らかになっている。
【目的・方法】
本試験においては、ユーグレナ及びパラミロンの NASH 及び線維化に対する効果について STAM®マウスを用いて検証した。具体的には、5 週齢時の STAM®マウスに、ユーグレナ粉末あるいはパラミロン粉末を 27 日間強制経口投与し、9 週齢時に屠殺した。その後、肝臓のシリウスレッド染色によって線維化の比較、肝臓の NAFLD スコアの算出による NASH 病態の重症度の比較を行った。
【結果・考察】
シリウスレッド染色によって肝臓の線維化を比較したところ、ユーグレナ摂取群、パラミロン摂取群いずれも対照群と比較して有意に線維化のスコアが低値となった。また、NASH 病態の重症度を示す NAFLD スコアにおいては、ユーグレナ摂取群では値が低減せず、パラミロン摂取群では、対照群と比較して、特に炎症の度合いを改善することで、低値となる傾向が見られた。
以上のことから、ユーグレナは、炎症に関与しない経路で肝臓の線維化を抑制し、パラミロンは、炎症を改善することによって、肝臓の線維化を防御した可能性が示唆された。NASH からの発癌因子である線維化を抑制することは肝がんを防ぐことにつながるため、食品としてのユーグレナ及びパラミロンを継続的に摂取することで、線維化を抑制することにより、がん発生の予防に機能する可能性がある。

euglena, non-alcoholic steatohepatitis, anti-fibrotic activity

講演番号：4A08a10
講演日時：3 月 20 日 11:45～ A 校舎 08 会場

緑藻由来カロテノイドシフォナキサンチンの肝臓脂質合成抑制作用とそのメカニズム
The inhibitory effect of siphonaxanthin on hepatic lipogenesis and its mechanism
○鄭 家聞、真鍋 祐樹、金 珉智、後藤 剛、河田 照雄、菅原 達也（京大農）
○JIAWEN ZHENG, YUKI MANABE, MINJI KIM, TSUYOSHI GOTO, TERUO KAWADA, TATSUYA SUGAWARA (Kyoto Univ.)

【目的】近年、非アルコール性脂肪性肝疾患の罹患率は世界中で増加し、先進国では成人の約 30%に相当することが報告されている。糖尿病、血中脂質異常症、高血圧などの疾患は非アルコール性脂肪性肝疾患と合併することで、さらなる深刻な病態と高い死亡率につながる。そこで、非アルコール性脂肪性肝疾患に対して、予防や改善効果を持つ天然物質の探索が注目されている。ミル、ヤブレグサ、クビレズタなどの緑藻に含まれるカロテノイドであるシフォナキサンチンは抗肥満作用、血管新生抑制作用、マスト細胞脱顆粒抑制作用などを有することが見出されている。本研究ではシフォナキサンチンの非アルコール性脂肪性肝疾患に対する予防と改善効果の可能性を評価し、そのメカニズムを解明することを目的として、培養細胞を用いた検討をおこなった。
【方法および結果】ヒト肝がん由来細胞 HepG2 を肝臓モデルとして用いた。核内レセプターLXR α のアゴニストを用いた脂質合成経路を過剰に促進させた条件下において、0.5μM から 2.0μM のシフォナキサンチン処理により、細胞内トリアシルグリセロールのレベルが有意に低下した。このとき、核内転写因子 *SREBP-1c* と脂質 *de novo* 合成に関連する遺伝子群の発現量が有意に抑制された。脂肪酸の取り込みと輸送に関わる *CD36* と *FABP1* の発現量も有意な低下を示した。レポータージーンアッセイにより、アゴニストによる LXR α 活性化がシフォナキサンチン添加によって有意に阻害されることが確認され、シフォナキサンチンは LXR α のアンタゴニストとして働く可能性が示唆された。
　シフォナキサンチンとそのエステル体であるシフォネインの HepG2 細胞への取り込みを評価したところ、シフォネインと比べて、シフォナキサンチンは速やかに細胞内に取り込まれ、高い蓄積量を示した。また、シフォナキサンチン代謝産物は細胞内からわずかではあるが検出された。したがって、シフォナキサンチン自体が肝臓脂質合成抑制作用の活性本体であると考えられた。一方、シフォネインの一部は細胞内で加水分解され、シフォナキサンチンへと代謝されたが、蓄積量はわずかであった。
　以上の結果から、シフォナキサンチンは肝細胞の脂質合成を抑制することで、非アルコール性脂肪性肝疾患に対して予防または改善作用を示す可能性が期待された。

siphonaxanthin, hepatic lipogenesis, carotenoid

発表責任者：ZHENG JIAWEN（teikamon@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4A08a11
講演日時：3 月 20 日 12:00～ A 校舎 08 会場

# (−)-Epigallocatechin-3-gallate の胃粘膜細胞に対するレプチン分泌刺激作用の発見

Stimulation of leptin secretion from gastric mucosal cells by (−)-epigallocatechin-3-gallate

○太田 裕基[1]、石井 剛志[2]、向井 克之[3]、松山 彰収[3]、赤川 貢[1] ([1]大阪府大院・生命環境、[2]神戸学院大・栄養、[3]（株）ダイセル)
○Hiroki Ota[1], Takeshi Ishii[2], Katsuyuki Mukai[3], Akinobu Matsuyama[3], Mitsugu Akagawa[1] ([1]Sch. of life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Fac. of Nutr., Kobe Gakuin Univ., [3]Daicel Corp.)

【背景と目的】 主要な緑茶カテキンである (–)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) は，ヒトの健康維持や増進に寄与する多様な機能性を有しており，近年ではその抗肥満作用が特に注目されている．また，興味深いことに EGCG の摂取が高脂肪食負荷マウスの摂餌量を減少させることが最近になって報告されている．しかしながら，その生体利用性の低さから抗肥満効果の作用機序の全容は解明されておらず，消化管上皮への作用や腸内細菌による代謝産物の関与の可能性が指摘されている．レプチンは視床下部に作用し，食欲の抑制やエネルギー消費増大をもたらす抗肥満ホルモンである．レプチンは主に脂肪細胞から分泌されるが，胃粘膜細胞からも分泌されることが近年明らかにされている．胃粘膜細胞のレプチン分泌は摂食によって刺激されることが示唆されているものの，分泌を刺激する食品因子は未解明のままである．このような背景から我々は，EGCG が胃粘膜細胞に作用してレプチン分泌を刺激することで抗肥満効果を発揮するのではないかと考えた．そこで本研究では，緑茶に含有される主要なカテキンの培養胃粘膜細胞に対するレプチン分泌刺激作用の検証を実施した．

【方法と結果】 本研究では，ラット由来の正常胃粘膜細胞 RGM1 を用いてレプチン分泌刺激作用の検証を行った. RGM1 細胞をそれぞれ 25 μM の濃度の (–)-epicatechin (EC), (–)-epigallocatechin (EGC), (–)-epicatechin-3-gallate (ECG), および EGCG に 30 分間暴露し，培地中へ放出されたレプチン量をサンドイッチ ELISA 法によって測定した．その結果，EGCG だけが顕著にレプチン分泌を刺激することを見出した. EGCG は 5–50 μM の濃度域において濃度依存的に培地中へのレプチン放出量を増大させ，暴露時間 5 分という短時間で RGM1 細胞のレプチン分泌を促すことが判明した. EGCG によるレプチン分泌刺激が細胞膜傷害に起因するかどうかを，培地中に放出された乳酸脱水素酵素活性を測定することにより評価した結果，EGCG 濃度 50 μM まで傷害は認められなかった．さらに，小胞体-ゴルジ体間輸送を阻害する brefeldin A で前処理した RGM1 細胞を EGCG に暴露したところ，レプチンの分泌が有意に抑制されたため, EGCG が誘導するレプチン分泌には小胞体-ゴルジ体間輸送経路が関与していることが明らかになった．また，EGCG は transient receptor potential channel の TRPV1 と TRPA1 のアゴニストとして知られているため，それぞれのリガンドである capsaicin と allyl isothiocyanate を RGM1 細胞に暴露し，レプチンの分泌を評価した．しかし，両リガンドともレプチン分泌を刺激しなかった．

leptin, (-)-epigallocatechin-3-gallate, anti-obesity

講演番号：4A08a12
講演日時：3 月 20 日 12:15～ A 校舎 08 会場

# LC-MS を用いたトマト含有抗炎症化合物の広範囲スクリーニングおよび同定化合物における作用機序の解明

# A broad range of screening for anti-inflammatory compounds in tomato extract using LC-MS and elucidating the mechanism of their functions

○毛利 晋輔[1]、高橋 春弥[2]、坂井 麻衣子[1]、高橋 慎吾[3]、脇 尚子[2]、相澤 宏一[3]、菅沼 大行[3]、荒 武[2]、柴田 大輔[2]、後藤 剛[1]、河田 照雄[1] ([1]京大院農・食品生物、[2]京大院農・トマト講座、[3]カゴメ・イノベーション本部)

○Shinsuke MOHRI[1], Haruya TAKAHASHI[2], Maiko SAKAI[1], Shingo TAKAHASHI[3], Naoko WAKI[2], Koichi AIZAWA[3], Hiroyuki SUGANUMA[3], Takeshi ARA[2], Daisuke SHIBATA[2], Tsuyoshi GOTO[1], Teruo KAWADA[1] ([1]Div. Food Sci. Biotechnol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]KAGOME Tomato Disc. Lab., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [3]Innovation Division, KAGOME CO., LTD.,)

【目的】トマト (*Solanum lycopersicum*) は各地で栽培され、世界で最も消費量の多い野菜の 1 つである。トマトの摂食は糖尿病などに代表される生活習慣病の発症リスクを低減させることが先行研究より報告されているが、この効果を発揮する機能性成分および作用機序については、解明すべき点が多く残されている。一方、肥満は生活習慣病の発症に深く関与しており、その要因の一つとして、NO および TNF-α、MCP-1 などの炎症性メディエータにより生じる脂肪組織内の慢性的炎症反応が挙げられる。そのため、この炎症反応を低減する化合物の探索・同定は、先述したトマトの機能性成分および作用機序解明の一助となることが期待される。本研究では、液液分配やオープンカラム、HPLC などの従来法によるトマト中成分の分離・精製に加え、LC-MS を用いた成分解析を併用することで、トマト果実中に含まれる抗炎症化合物を広範囲に探索・同定し、その機能および作用機序について検討を行った。

【方法】トマト果実抽出物の精製により得られた画分について、炎症性メディエータの 1 つである NO の産生抑制効果を指標に抗炎症化合物の探索を行った。液液分配で得られた酢酸エチル画分を出発として、最終的に HPLC 精製により得た 650 画分の中で NO 産生抑制効果が認められた 53 画分について、LC-MS を用いた分析を行い、抗炎症作用に寄与する化合物の同定を試みた。また、同定された抗炎症化合物および酢酸エチル画分について、NO と同様に炎症性メディエータである TNF-α、MCP-1 の産生抑制効果を検討した。さらに、これら抗炎症作用の機序解明のため、関連タンパク質の発現を評価した。

【結果】LC-MS を用いた抗炎症化合物の探索を行った結果、トマト果実が有する抗炎症能は、少数の成分ではなく、多様な成分に起因することが示唆された。この抗炎症能を有する成分として、既知の化合物が複数同定される一方、未知の化合物も多数検出され、そのうち、約半数については組成式を決定することができた。また、同定された抗炎症化合物および多様な抗炎症化合物の含有が示唆された酢酸エチル画分は、NO だけでなく TNF-α、MCP-1 の産生も抑制した。さらに、これら抑制効果の作用機序として、炎症により惹起される MAPK リン酸化および Iκ-Bα分解の抑制が示された。

insulin resistance, inflammation, tomato

講演番号：4B09a01
講演日時：3 月 20 日 09:20～ B 校舎 09 会場

# Carnosine inhibits proliferation, migration and invasion in human bladder cancer EJ cells

○Byungdoo Hwang, Sung Lyea Park, Yujin Park, Yujeong Gho, Bog-Hieu Lee, Sung-Kown Moon (Chung-ang Univ.)

Bladder cancer is a prevalent malignancy and the ninth most common type of cancer worldwide. Carnosine (β-alanyl-L-histidine), described as an enigmatic peptide for its antioxidant, anti-aging and especially anticancer properties, has been demonstrated to play an anti-tumorigenic role in certain types of cancer. However, its exact molecular function in human cancer remains unclear. In this study, the effect of carnosine on cell proliferation and metastasis its underlying mechanisms were investigated in the cultured human bladder cancer EJ cells. Treatment of carnosine suppressed the proliferation of EJ cells. Flow cytometry analysis revealed that carnosine treated cells accumulated in the G1-phase of the cell cycle, and cyclin D1 and CDK4 were significantly downregulated. This G1-phase cell cycle arrest was due in part to the upregulation of p21CIP1/WAF1. Carnosine treatment exhibit upregulation of ERK1/2 and JNK phosphorylation, and downregulation of p38 phosphorylation compared to their control levels without altering the AKT phosphorylation level. In addition, treatment of carnosine obstructed the migration and invasion of EJ cells. Carnosine markedly reduced expression of MMP-9 through the suppression of transcription factors NF-κB, AP-1 and Sp-1 binding activities in EJ cells. Collectively, these results demonstrated that carnosine reduced cyclin D1, and CDK4 expression through the induction of p21WAF1 expression, increased ERK1/2 and JNK phosphorylation and decreased p38 phosphorylation, and prevented MMP-9 expression by the inhibition of transcription factors NF-κB, AP-1 and Sp-1 in EJ cells, which led to the inhibition of proliferation and metastasis in bladder cancer EJ cells. These results provide new insight into potential therapies for the treatment of bladder cancer.

bladder cancer, carnosine, growth & metastasis

発表責任者：Sung-kwon Moon（sumoon66@dreamwiz.com）

講演番号：4B09a02
講演日時：3 月 20 日 09:35～ B 校舎 09 会場

ワサビ機能性成分の抗癌作用および抗癌剤との併用効果の解析
Anti-cancer mechanisms of Wasabi 6-MSITC and combinational effects with chemotherapeutic drugs.
○矢野 敏史[1]、坂尾 こず枝[1,2]、侯 徳興[1,2] ([1]鹿大連合農研、[2]鹿大農)
○Satoshi YANO[1], Kozue SAKAO[1,2], De-Xing Hou[1,2] ([1]Kagoshima Univ., United Gra. Sch. of Agr. Sci., [2]Kagoshima Univ., Fac. Agri.)

【背景・目的】
癌は我が国における死因の第 1 位であり、その数は年々増加している。癌治療に用いられる抗癌剤の多くは、p53 を介したアポトーシス誘導によって抗腫瘍効果を示すことが知られている。p53 は癌抑制遺伝子であり、アポトーシス誘導の中心的な役割を担うが、癌の約半数で p53 の変異が認められ、抗癌剤の効果を減衰させる原因となっている。抗癌剤開発において、p53 非依存的なアポトーシス誘導は非常に重要になっている。

6-(Methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate (6-MSITC) はワサビ [*Wasabia japonica* (Miq.) Matsumura]に多く含まれているイソチオシアネート類であり、抗酸化作用や抗炎症作用などの機能性を有することが知られている。これまでの研究により、ラットへの 6-MSITC の経口投与は大腸癌の発癌を抑制できることが報告されている。しかし、抗腫瘍効果におけるその作用機序は未だ明らかにされていない。そこで、本研究では 2 種のヒト大腸癌細胞株 HCT116 $p53^{+/+}$と HCT116 $p53^{-/-}$を用いて、6-MSITC による細胞死誘導機構を解析した。さらに、6-MSITC と抗癌剤との併用を試み、抗癌剤の効果が改善できるかを検証した。

【結果】
まず、癌細胞増殖抑制効果を検証したところ、6-MSITC は HCT116 $p53^{+/+}$と HCT116 $p53^{-/-}$のどちらにおいても同等の効果を有することが示された。また、アポトーシス誘導の解析においても、6-MSITC は両細胞ともにアポトーシス誘導がみられた。さらに、6-MSITC によって顕著な p53 の活性化はみられなかった。よって、6-MSITC は p53 非依存的なアポトーシス誘導能を有することが明らかとなった。これらに対して、抗癌剤 (Doxorubicin、5-Fluorouracil、Cisplatin)は HCT116 $p53^{-/-}$よりも HCT116 $p53^{+/+}$において強い癌細胞増殖抑制効果とアポトーシス誘導がみられ、抗癌剤の p53 依存性が認められた。そこで、抗癌剤の効果改善を目的に、6-MSITC と抗癌剤との併用実験を行ったところ、Doxorubicin において特に強い効果増強がみられ、細胞増殖抑制効果、アポトーシス誘導ともに Doxorubicin の p53 依存性が改善されることが示された。

【結論】
これらの結果は 6-MSITC による大腸癌予防に新たな知見を提供するものであり、6-MSITC と抗癌剤との併用は大腸癌の予防と治療に新しいアプローチとして期待される。

Wasabi 6-MSITC, Apoptosis, Chemotherapeutic drugs

発表責任者：侯徳興（hou@chem.agri.kagoshima-u.ac.jp）

講演番号：4B09a03
講演日時：3 月 20 日 09:50～ B 校舎 09 会場

セージ由来 STAT3 活性化抑制物質の精製
Purification of STAT3 signaling inhibitors derived from sage
○柳道 真帆[1]、西野 勝俊[1,2]、神戸 大朋[1]、増田 誠司[1]、KSOURI Riadh[3]、礒田 博子[4]、永尾 雅哉[1]([1]京大院・生命、[2]京大院・農、[3]CBBC・Tunisia、[4]筑波大院・生命環境・北アフリカ研究センター)
○Maho YANAGIMICHI[1], Katsutoshi NISHINO[1,2], Taiho KAMBE[1], Seiji MASUDA[1], Riadh KSOURI[3], Hiroko ISODA[4], Masaya NAGAO[1] ([1]Grad Sch. Biostudies Kyoto Univ., [2]Grad Sch. Agriculture Kyoto Univ., [3]CBBC・Tunisia, [4]Grad Sch. Faculty of Life and Environmental Science Tsukuba Univ.)

【背景・目的】Signal transducers and activator of transcription 3 (STAT3)は、細胞増殖や生存を制御する転写因子である。多くの癌細胞において STAT3 の異常な活性化が認められており、癌増悪化に関与するとされている。さらに、関節リュウマチなどの炎症性疾患においても STAT3 の活性化が認められており、STAT3 はこうした様々な疾患の治療ターゲットとして重要である。STAT3 の活性化機構としては、インターロイキン 6（IL-6）が受容体に結合することで、受容体複合体を構成する gp130 に会合する Janus kinase(JAK)が活性化し、STAT3 がリン酸化されることが知られている。リン酸化された STAT3 は二量体を形成し、核内に移行後、標的遺伝子である IL-6 応答配列(Acute phase response element：APRE)に結合することで、転写を活性化する。本研究では、古くから薬用植物として利用されるセージに由来する STAT3 活性化抑制化合物を探索し、その分子メカニズムの解明を行うことを目的とした。
【方法】STAT3 活性化抑制効果はレポーターアッセイにより評価した。レポーターアッセイには junB プロモーター上流に 4 個のタンデムに連結した APRE（4×APRE)、その下流にホタル由来ルシフェラーゼレポーター遺伝子を接続したプラスミドと、β-actin プロモーターにβ-ガラクトシダーゼ遺伝子を接続したプラスミドを使用した。これらを HepG2 細胞（ヒト肝癌由来細胞株）に共導入し、96 well plate に播種して 38 時間培養した。その後各セージ画分を添加し、4 時間後に細胞中のルシフェラーゼ量を測定することにより、セージ由来物質による IL-6 誘導性の STAT3 活性化抑制効果を評価した。トランスフェクション効率はβ-ガラクトシダーゼ活性で補正した。
セージ地上部乾燥体 200 g をメタノールで抽出した。その抽出物を水と酢酸エチルで分配後、酢酸エチル相をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供した。上記のレポーターアッセイにより活性の認められた画分を高速液体クロマトグラフィーに供し、測定波長 254 nm で分取した。
【結果・考察】シリカゲルクロマトグラフィーで分画し、活性の認められた画分を ODS-3 カラムで分取したところ、UV 吸収のピークが見られた画分に強い STAT3 活性化抑制効果が認められた。STAT3 活性化抑制の作用点としては、STAT3 のリン酸化阻害や二量体 STAT3 の標的遺伝子 APRE への結合阻害が考えられる。現在こうした作用点を明らかにし、セージ由来化合物による STAT3 活性化抑制メカニズムの解明をすべく、研究を進めている。
本研究は、JST/JICA 地球規模課題対応国際科学技術協力プログラムの支援で行われた。

STAT3, cancer, Sage

講演番号：4B09a04
講演日時：3 月 20 日 10:05～ B 校舎 09 会場

Piceatannol による制がん剤ターゲット human Glyoxalase I 阻害の解析
Analysis of the inhibition of an anticancer target human Glyoxalase I by piceatannol

○高澤 涼子[1,2]、赤羽 悠[1]、嶋田 奈実[1]、山本 貴之[3]、内田 裕子[3]、齋 政彦[3]、吉森 篤史[4]、田沼 靖一[1,2] ([1]東京理大薬、[2]東京理大ゲノム創薬研セ、[3]森永製菓(株)、[4](株)理論創薬研究所)
○ Ryoko TAKASAWA[1,2], Haruka AKAHANE[1], Nami SHIMADA[1], Takayuki YAMAMOTO[3], Hiroko UCHIDA[3], Masahiko SAI[3], Atsushi YOSHIMORI[4], Sei-ichi TANUMA[1,2] ([1]Facul. Pharm. Sci., Tokyo Univ. Sci., [2]Genome and Drug Res. Center, Tokyo Univ. Sci., [3]Morinaga&Co.,Ltd., [4]ITM, Inc.)

【目的】Glyoxalase I（GLO I）は，解糖系で生じるカルボニルストレスの消去システムを担う主酵素であり，肺がん，乳がん，大腸がんおよび前立腺がんや，抗がん剤に耐性を示す培養がん細胞株で高発現がみられることが報告されていることから，新しいがん治療薬開発のターゲットとして有望視されている. 我々は, *in silico* 手法を用いて GLO I 阻害剤探索を行い, 天然植物由来有機化合物から 5-OH flavone 骨格化合物の myricetin や, アントシアニジンの delphinidine を GLO I 阻害化合物として見出している．さらに，myricetin ファーマコフォアを用いて天然有機化合物ライブラリから GLO I 阻害剤の新しい scaffold を探索し，スチルベン骨格を見出した．本研究では，スチルベン骨格化合物の GLO I 阻害活性測定および培養がん細胞への効果を検証し，新たな GLO I 阻害剤ファーマコフォアを構築することを目的とした.

【方法】スチルベン骨格をもつ 5 種類の化合物（4-((1E)-2-phenylvinyl)phenol, resveratrol, oxyresveratrol, piceatannol, 3,3',4,5'-tetramethoxypiceatannol）の GLO I 阻害活性を，GLO I 酵素反応生成物 *S*-D-Lactoylglutathione の 240 nm における吸光度測定による方法で評価した．高い阻害効果を示した化合物について，GLO I 阻害剤高感受性肺がん細胞株 NCI-H522 細胞と GLO I 阻害剤低感受性肺がん細胞株 NCI-H460 細胞を用い，WST assay によって細胞生存率への影響を比較した．さらに，*in silico* 手法を用いて GLO I との予測結合様式を検討した.

【結果・考察】スチルベン骨格をもつ 5 種類の化合物のうち，piceatannol が最も強い GLO I 阻害活性を示した（$IC_{50}$ = 0.76 μM）．piceatannol で処理した NCI-H522 細胞では，細胞生存率が piceatannol 濃度依存的および時間依存的に低下した（24, 48, 72 時間処理での $EC_{50}$ = 53, 23, 17 μM）. また, piceatannol 処理による細胞生存率低下は，GLO I 低依存性の NCI-H460 細胞よりも，GLO I 高依存性の NCI-H522 細胞の方で強くみられた．さらに，NCI-H522 細胞への GLO I 過剰発現によって，piceatannol 処理による細胞生存率低下が抑制された．以上から，piceatannol によるがん細胞生存率の低下に GLO I 阻害が寄与することが示唆された．*in silico* 手法を用いた解析から，piceatannol は，既存の阻害剤として GLO I との複合体結晶構造が報告されている GSH analog と baicalein の 2 通りの結合様式で GLO I 活性中心に結合しうることが予測された．このように 2 つの結合様式で結合できるということが，piceatannol の高い阻害活性に寄与していることが示唆された．したがって，この 2 つの結合様式を同時に満たすファーマコフォアが，新規 GLO I 阻害剤リード化合物の設計に有用であると考えられる.

Glyoxalase I, Piceatannol, Anticancer

発表責任者：高澤　涼子（takasawa@rs.noda.tus.ac.jp）

講演番号：4B09a05
講演日時：3 月 20 日 10:20～ B 校舎 09 会場

# ザクロ由来ポリフェノールによる大腸ガン抑制効果とその分子基盤

# Pomegranate-derived polyphenols inhibit the growth of colon cancer cells through activating SIRT1

○花田 栄[1]、堀 美久[1]、伊東 秀之[2]、片倉 喜範[3]([1]九大院生資環、[2]岡山県大保福、[3]九大院農院)
○Sakae HANADA[1], Miku HORI[1], Hideyuki Ito[2], Yoshinori KATAKURA[3] ([1]Kyushu Univ., [2]Okayama Pref.Univ., [3]Kyushu Univ.)

【目的】
大腸がんは、40 歳代から罹患率が増加し始め、加齢に伴いその罹患率は高くなる。現在の日本における罹患数は全てのがんの中で第 2 位、死亡率は 3 位という統計結果が示されており、ガンの中でも患者数の多い疾患である。本研究では、食品と生体との接点である腸管に着目し、大腸がん抑制作用を示す食品成分の機能性の分子基盤を明らかにすることを目的とした。さらに、長寿遺伝子として知られているサーチュイン遺伝子群のうちの 1 つである SIRT1 に着目し、食品成分の機能性に対する寄与を解析した。本研究室において行われた先行研究により、SIRT1 を活性化する食品成分としてザクロ由来ポリフェノール数種類が同定されていた。本研究ではそれらのポリフェノールによる大腸がん抑制作用の分子基盤を検証した。
【方法】
本研究では、ヒト結腸ガン由来 Caco-2 細胞及び DLD-1 細胞を使用した。まず先行研究により、SIRT1 プロモーター活性化能が確認されているザクロ由来ポリフェノール Punicalin 及び Punicalagin に対して定量 RT-PCR 法を行い、これらのポリフェノールの SIRT1 転写増強効果を検証した。さらにこれらのポリフェノールの、DLD-1 細胞のコロニー形成能、足場非依存的増殖能、細胞増殖能、さらには大腸がんの増殖を規定する β-カテニン活性に対する効果を検証した。
【結果】
定量 RT-PCR を行った結果、Punicalin 及び Punicalagin は、DLD-1 細胞内の内在性 SIRT1 遺伝子の発現を有為に増強することが明らかとなった。次にこれらのポリフェノールが、β-カテニン依存的な DLD-1 細胞の増殖に与える影響を検証した結果、Punicalin 及び Punicalagin がともに DLD-1 細胞の増殖を有意に抑制するとともに、スフェロイド培養による足場非依存的増殖能の検証では濃度依存的に強くその増殖を抑制することが明らかとなった。またこれらポリフェノールは同時に、コロニー形成能も強く抑制することが明らかとなった。そこでこれらポリフェノールの、DLD-1 細胞における β-カテニン活性に対する効果を、M50 Super 8×TOPFlash レポーターベクターを用いたルシフェラーゼアッセイにより評価した結果、これらポリフェノールが β-カテニン活性を抑制することが明らかとなった。

Pomegranate, colon cancer, SIRT1

発表責任者：花田栄（s.flower.hana@gmail.com）

講演番号：4B09a06
講演日時：3 月 20 日 10:35～ B 校舎 09 会場

# 食品成分ベンジルイソチオシアネートによる動原体を標的とした大腸がん細胞増殖阻害作用

# Benzylisothiocyanate inhibits the proliferation of colon cancer cells by targeting kinetochore

○安部 奈緒美[1,2,3]、國末 成美[2]、宗正 晋太郎[2]、村田 芳行[2]、河合 慶親[1]、佐藤 あやの[4]、守屋 央朗[5]、中村 宜督[2] ([1]徳大院医歯薬学、[2]岡大院環境生命、[3]学振特別研究員、[4]岡大院自然科学、[5]岡大異分野コア)

○ Naomi ABE[1,2,3], Narumi KUNISUE[2], Shintaro MUNEMASA[2], Yoshiyuki MURATA[2], Yoshichika KAWAI[1], Ayano SATOH[4], Hisao MORIYA[5], Yoshimasa NAKAMURA[2] ([1]Tokushima Univ. Inst. Biomed. Sci., [2]Okayama Univ. Environ. & Life Sci., [3]JSPS fellow, [4]Okayama Univ. Nat. Sci. & Technol., [5]Okayama Univ. RCIS)

ベンジルイソチオシアネート（BITC）は、主にパパイヤに由来する含硫化合物であり、有力ながん予防剤として期待されている。BITC による腫瘍形成の阻害には、がん細胞の増殖抑制が重要であると考えられているが、そのメカニズムには不明な点が多く存在する。真核細胞のモデル生物である出芽酵母は、その全ゲノム塩基配列の解読が終了しており、ヒトの細胞と比べて「低コスト・簡便・迅速」なスクリーニングを行なうことができるため、これまでに薬剤標的の探索に広くもちいられてきた。さらに、酵母はヒトと同様の細胞分裂や DNA 修復の機構を持つことから、BITC の細胞増殖抑制作用に関わる標的分子を探索する上で特に適していると考えた。そこで本研究では、genome-wide multi-copy plasmid collection が導入された出芽酵母を用いて、過剰発現により酵母に BITC 耐性を与える遺伝子の同定を試みた。さらに、ヒト大腸がん細胞株を用いて、同定した遺伝子の細胞増殖抑制作用におけるヒトでの役割を調査した。

酵母がもつ全遺伝子を網羅的に過剰発現した酵母を用いてスクリーニングを行った結果、動原体構成タンパク質の一つをコードする *MTW1* を含む 12 の遺伝子を、BITC 耐性に貢献する遺伝子の候補として同定した。そこで、Mtw1 のヒトホモログである Mis12 の過剰発現とノックダウンが BITC による細胞増殖抑制作用に与える影響をヒト大腸がん由来 HCT-116 細胞において調査した。その結果、BITC による細胞増殖抑制作用は Mis12 の過剰発現により弱められ、Mis12 のノックダウンにより強められた。また、BITC は Mis12 のリン酸化とユビキチン化を増加させ、プロテアソーム依存的に Mis12 タンパク質レベルを減少させた。さらに、細胞周期解析をおこなった結果、BITC による $G_2$/M 期停止の誘導は Mis12 の過剰発現により完全に抑えられた。また、BITC によるアポトーシスの誘導は Mis12 の過剰発現により部分的に弱められ、Mis12 のノックダウンにより強められた。以上の結果から、BITC はユビキチン・プロテアソーム系を介して動原体タンパク Mis12 を分解し、ヒト大腸がん細胞の増殖を抑制することが示唆された。

isothiocyanate, colon cancer, kinetochore

講演番号：4B09a07
講演日時：3 月 20 日 11:00～ B 校舎 09 会場

# $H_2S$ による緑茶カテキン EGCG のがん細胞致死誘導活性の増強

# $H_2S$ potentiates apoptosis-inducing effect of EGCG green tea polyphenol

○裵 宰君、熊添 基文、立花 宏文 (九大院農院・生機科)
○Jaehoon Bae, Motofumi Kumazoe, Hirofumi Tachibana (Kyushu Univ.)

【目的】緑茶カテキンである(−)-epigallocatechin-3-*O*-gallate (EGCG)は 67-kDa Laminin Receptor(67LR)依存的 cGMP 産生誘導を介して多くのがん細胞種（多発性骨髄腫細胞、急性骨髄性白血病、慢性リンパ腫など）に対しアポトーシスを誘導する[1)]。しかしながら、こうしたがん細胞には cGMP 分解酵素ホスホジエステラーゼ 5(PDE5)が高発現しており、生理的低濃度における EGCG の細胞致死作用は限定的である。一方、硫化水素（$H_2S$）は PDE5 を阻害することが報告されている。そこで本研究では、EGCG のがん細胞致死誘導作用に対する $H_2S$ の増強効果を検討した。

【方法及び結果】$H_2S$ 誘導剤 NaHS を作用させた多発性骨髄腫細胞株では PDE5 の酵素活性が阻害された。そこで、EGCG の抗がん作用に対する $H_2S$ の増強効果を検討するため、マウス多発性骨髄腫細胞株 MPC-11 を移植した BALB/c マウスに EGCG ならびに NaHS を投与した。その結果、EGCG と NaHS を併用投与した群は単独投与群と比較して著しい腫瘍成長抑制ならびに生存期間の延長が観察された。EGCG は 67LR を介して cGMP/protein kinase Cδ(PKCδ)/acid sphingomyelinase (ASM)経路を活性化しアポトースを誘導する。そこで屠殺後に回収した腫瘍組織における PKCδ のリン酸化、ASM 活性、Caspase-3 の断片化を評価したところ、EGCG と NaHS を併用投与したマウス腫瘍組織では PKCδ、ASM、Caspase-3 が顕著に活性化されていることが確認された。

以上の結果より、NaHS は PDE5 を阻害することで EGCG によって活性化される 67LR/cGMP/PKCδ/ASM 経路依存的なアポトーシス誘導作用を増強することが示唆された。

1) *J Clin Invest.* **123**, 787-799 (2013)

hydrogen sulfide, cancer, EGCG

発表責任者：立花宏文（tatibana@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：4B09a08
講演日時：3 月 20 日 11:15～ B 校舎 09 会場

緑茶カテキン EGCG のがん幹細胞抑制作用に関与する分子の同定
Identification of the molecule involved in the cancer stem cell inhibitory effect of green tea catechin EGCG
○山田 脩平、黄 宇慧、塚本 俊太郎、立花 宏文 (九大農)
○SHUHEI YAMADA, HUANG YUHUI, SHUNTARO TSUKAMOTO, HIROFUMI TACHIBANA (Kyushu Univ.)

がん治療においてがん幹細胞とよばれる少数の細胞集団が化学療法に対して耐性を示し、がんの再発や転移の原因となる。我々は緑茶カテキンの主成分である(−)-Epigallocatechin-3-*O*-gallate(EGCG)がメラノーマ細胞においてがん幹細胞の性質の 1 つであるコロニー形成能を阻害すること、また、メラノーマ細胞の転移を抑制することを明らかにしている。そこで本研究では、EGCG のがん幹細胞抑制作用メカニズムを明らかにすることを目的とした。

メラノーマ幹細胞は未分化状態にあり、色素産生能が低いことが知られている。マウスメラノーマ細胞株 B16 をベースとして Genetic suppressor elements(GSE)法により EGCG のがん細胞増殖抑制作用に関与する遺伝子をスクリーニングした。その中から色素を指標としてメラノーマ幹細胞に関与する遺伝子を探索し、StAR-related lipid transfer domain protein 3(STARD3)を同定した。STARD3 は後期エンドソームに存在し、コレステロールの輸送に関与することが知られている。しかしながら、メラノーマにおける STARD3 の役割は不明であった。正常皮膚組織とメラノーマ腫瘍組織における STARD3 の発現を免疫組織染色により評価したところ、STARD3 がメラノーマ腫瘍組織において高発現していた。メラノーマ細胞において STARD3 をノックダウンさせることにより、メラノーマ幹細胞マーカーである Oct-4, CD271, JARID1B の発現が低下し、がん幹細胞形質の 1 つであるスフェロイド形成能が顕著に抑制された。メラノーマ転移モデルにより、転移に対する STARD3 の発現抑制の影響を検討したところ、STARD3 をノックダウンした B16 細胞を移植したマウスではメラノーマの肺転移が抑制された。以上の結果から、STARD3 はメラノーマ幹細胞機能の維持に重要であることが示された。

EGCG, Cancer stem cell, Stard3

発表責任者：山田脩平（shuhei09072@gmail.com）

講演番号：4B09a09
講演日時：3 月 20 日 11:30～ B 校舎 09 会場

# タマネギ由来成分 Onionin A はマクロファージの活性化を制御することで腫瘍の進展を抑制する

# Onionin A isolated from onion suppresses tumor progression by regulating macrophage activation.

○藤原 章雄[1]、坪木 純子[1]、Horlad Hasita[1]、野原 稔弘[2]、池田 剛[2]、竹屋 元裕[1]、菰原 義弘[1] ([1]熊大医、[2]崇城大薬)
○ Yukio Fujiwara[1], Jyunko Tsuboki[1], Hasita Horlad[1], Toshihiro Nohara[2], Tsuyoshi Ikeda[2], Motohiro Takeya[1], Yoshihiro Komohara[1] ([1]Kumamoto Univ., [2]Sojo Univ.)

マクロファージ（Mø）は微生物などの病原体に対する防御機能の一翼を担うとともに、体内の老廃物の処理を介して生体の恒常性維持に重要な役割を果たしている。また、T 細胞への抗原提示や細胞性免疫のエフェクターとしての機能を有していることから Mø の活性化が、感染症や癌をはじめとする多くの疾患の病態形成に関わることが知られている。近年、この Mø の活性化過程には、従来の古典的活性化経路に加えてオルタナティブ活性化経路が存在することが明らかとなってきた。すなわち Th1 タイプのサイトカインで刺激を受けた炎症惹起性の古典的活性化マクロファージ（M1 Mø）に加えて、Th2 タイプのサイトカインによって刺激され抗炎症性に働くオルタナティブ活性化マクロファージ（M2 Mø）が存在する。つまり、Mø は、その活性化経路の違いによって 2 種類に大別され、それぞれが相反する機能を有していることから、病態の発症ならびに抑制（改善）にも関わっている。例えば、M2 Mø は抗炎症作用を有するが、逆に腫瘍組織においては血管新生を誘導し、さらに IL-10 等の免疫抑制分子を産生することで抗腫瘍免疫を抑制することが明らかとなっている。つまり、M2 Mø は抗腫瘍免疫を抑制することで腫瘍増殖に関与しており、一方、M1 Mø は抗腫瘍免疫を活性化することで、腫瘍の増殖を抑制することがわかってきた。ゆえに、腫瘍内に浸潤する Mø を M2 タイプから M1 タイプに変換させることができれば腫瘍の増殖抑制が可能となる。

そこで、我々は食品由来成分による Mø 活性化制御を介した腫瘍増殖抑制を目指すため、Mø の活性化を M2 から M1 に制御する（M2 活性化を抑制する）食品成分の探索を行ったところ、タマネギ由来成分 Qnionin A（ONA）を同定したので紹介する（Fujiwara Y et al. *Mol Nutr Food Res* 2016, Tsuboki J et al. *Sci Rep* 2016）。

多くの癌腫と同様、卵巣癌においても Mø は微小環境により免疫抑制に働く M2 Mø に分化し、浸潤・血管新生を促進することで腫瘍増殖に関わる。ONA は *in vitro* にて STAT3 の活性化を阻害することで Mø の M2 分化を抑制し、卵巣癌細胞の増殖を抑制した。そこで、マウス腫瘍モデルにおける ONA の抗腫瘍効果について検討した。方法としては、マウス卵巣癌細胞 MOV を卵巣もしくは皮下に移植したマウス卵巣癌モデルならびに皮下腫瘍モデルを作成し、ONA 単独および cisplatin（CDDP）との併用効果を腫瘍重量の比較により評価した。その結果、卵巣癌モデルにおいて ONA 経口投与は腫瘍重量を有意に低下させた。さらに、皮下腫瘍モデルでは、ONA および CDDP 単独では効果が認められない投与量にて両者を併用すると腫瘍重量は有意に低下した。

以上より、ONA は癌細胞と Mø が共存するマウス生体内においても抗腫瘍効果が示されたことから、タマネギは抗腫瘍効果をもつ食品としての有用性が高いことが実証されたとともに、ONA は Mø の活性化制御という新たなメカニズムを有する抗ガン剤のリード化合物になりうる可能性が示唆された。

Onion, Macrophage, Tumor

講演番号：4B09a10
講演日時：3 月 20 日 11:45～ B 校舎 09 会場

# 食品機能性成分硫酸体の生理機能解明

# Functional analysis of sulfated bioregulatoly molecules

○下平 武彦[1]、黒木 勝久[1]、Liu Ming-Cheh[2]、榊原 陽一[1]、水光 正仁[1] ([1]宮崎大農工総合、[2]トレド大薬)
○Takehiko Shimohira[1], Katsuhisa Kurogi[1], Ming-Cheh Liu[2], Yoichi Sakakibara[1], Masahito Suiko[1] ([1]Univ. of Miyazaki, [2]The Univ. of Toledo)

【背景・目的】食品機能性成分の一種であるポリフェノール化合物は、抗ガン作用等の様々な生理機能を持つ。これらの化合物は摂取されると肝臓や腸管で硫酸転移酵素(SULTs)などの薬物代謝第二相酵素により代謝される。近年、このようなポリフェノールの代謝産物が、様々な細胞応答に関与し、多くの疾病に関わる G タンパク質共役型受容体(GPCR)に作用し機能することが報告された。硫酸体においても同様に GPCR へ作用する可能性が考えられるが、ポリフェノール化合物の硫酸体は大量調製法が確立されておらず、その硫酸体の機能性も未だ解明されていない。そこで本研究ではポリフェノール硫酸体の調製技術開発を行い、さらに硫酸体の GPCR への作用に焦点をあて、機能評価系の構築および、硫酸体の生理機能解明を目的に研究を行った。
【方法】　様々なポリフェノール化合物を含む培地にて、遺伝子工学的に SULT を発現させた大腸菌を培養した。その培養上清中に含まれる硫酸体を Diaion HP20 を用いて粗精製し、さらに Oasis-Wax カラムを用いて精製した。硫酸体は HPLC 解析、質量分析、NMR 解析にて構造決定した。次に、調製した硫酸体を用いて、ヒト肝がん細胞（HepG2）に対する増殖抑制効果を確認した。そして、各種 GPCR(GPR30, TGR5 等)を強発現させたヒト胎児腎細胞(293T)に、GPCR シグナルの下流の転写応答に関与する応答配列を組み込んだルシフェラーゼレポーターベクターを遺伝子導入し、GPCR 機能評価系を構築した。この細胞に調製した硫酸体を作用させ GPCR に対する機能評価を行った。
【結果・考察】　開発した手法にて様々な食品機能性成分硫酸体を調製した。その中で、ゲニステイン硫酸体やアピゲニン硫酸体等、いくつかの食品機能性成分硫酸体にガン細胞増殖抑制効果があることが判明した。さらに GPCR の機能評価系にて、ゲニステイン硫酸体の GPCR シグナルへの関与が示唆された。

sulfated polyphenol, anti-cancer, GPCR

発表責任者：榊原陽一（ysakaki@cc.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：4B09a11
講演日時：3 月 20 日 12:00～ B 校舎 09 会場

suksdorfin の脂肪細胞分化促進と糖代謝異常改善効果
Suksdorfin promotes adipocyte differentiation and improves abnormalities in glucose metabolism
○岩瀬 麻里[1]、西村 加奈子[1]、高橋 春弥[1]、高橋 信之[1]、谷口 雅彦[2]、馬場 きみ江[2]、村上 茂[3]、後藤 剛[1,4]、河田 照雄[1,4] ([1]京大院農・食品生物、[2]大阪薬大・薬、[3]福井県立大・生物資源、[4]京大・生理化学研究ユニット)
○Mari IWASE[1], Kanako Nishimura[1], Haruya Takahashi[1], Nobuyuki Takahashi[1], Masahiko Taniguchi[2], Kimiye Baba[2], Shigeru Murakami[3], Tsuyoshi Goto[1,4], Teruo Kawada[1,4] ([1]Div. Food Sci. Biotechnol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Dept. Pharmacognosy, Osaka Univ. of Pharmaceutical Sci., [3]Dept. Bioscience, Fukui Pref. Univ., [4]Res. Unit Physiol. Chem., Kyoto Univ.)

【目的】糖・脂質代謝異常の一因として脂肪細胞の肥大化が挙げられる。脂肪細胞の分化促進による小型化がその予防・改善に有効であると考えられ、脂肪細胞分化を促進するチアゾリジン誘導体がインスリン抵抗性改善薬として用いられている。先行研究において、3T3-L1 脂肪細胞を用いて脂肪細胞分化促進効果を有する天然化合物のスクリーニングを行った結果、ハーブ由来クマリン類である suksdorfin が強い脂肪細胞分化促進作用を有することが示された。そこで本研究では suksdorfin について、培養細胞を用いた脂肪細胞分化への影響と、実験動物を用いた糖・脂質代謝異常への影響を検討した。
【方法】実験① 3T3-L1 細胞を分化誘導する際に suksdorfin を添加し、48 時間培養した。6 日間の分化促進期間を経て、分化誘導 8 日目に中性脂肪蓄積量、脂肪細胞分化関連遺伝子（*aP2*、*Cebpα*、*Pparγ*、*Adiponectin*）の mRNA 発現量、培養上清中の adiponectin 量を測定した。また luciferase reporter assay を用いて PPARs 活性についても検討した。実験② 5 週齢雄性肥満・糖尿病モデルマウス（KK-A$^y$ マウス）に 60 kcal%高脂肪食（HFD）、0.05%または 0.1%suksdorfin 含有 HFD を摂取させ、10 日目に経口糖負荷試験（OGTT）、14 日目に解剖を行い、血液パラメーターと脂肪組織の解析を行った。
【結果・考察】① 3T3-L1 脂肪細胞への suksdorfin 添加は、中性脂肪蓄積量と脂肪細胞分化関連遺伝子である *aP2*、*Cebpα*、*Pparγ* の mRNA 発現量を増加させた。さらに、adiponectin の mRNA 発現量および分泌量も suksdorfin 添加により上昇したことから、suksdorfin 添加による脂肪細胞分化促進作用が示された。Luciferase assay によって suksdorfin の PPARs 活性を測定したところ、suksdorfin は脂肪細胞分化の鍵因子である PPARγ に対して活性化作用を有することが示された。② KK-A$^y$ マウスへの OGTT の結果より、suksdorfin 摂取は HFD 摂取による耐糖能異常を改善することが認められた。また suksdorfin 摂取は、血漿グルコース値、中性脂肪値、インスリン値の減少、血漿 adiponectin 値の上昇を認め、脂肪組織において *Pparγ*、*Lpl*、*Adiponectin* の mRNA 発現量を有意に増加させると共に、脂肪細胞の小型化を惹起した。
【結論】suksdorfin は PPARγ の活性化を介して脂肪細胞の分化を促進し、インスリン感受性の高い小型脂肪細胞の割合を増加させることが示唆された。また、suksdorfin は肥満により生じた糖・脂質代謝異常を改善する可能性が示唆された。

adipocyte differentiation, glucose metabolism, PPARγ

講演番号：4B09a12
講演日時：3 月 20 日 12:15～ B 校舎 09 会場

# イサダ加工残液の亜臨界処理による有効利用

# Utilization of residual liquid from Isada-krill processing by its treatment under subcritical conditions

○堀江 茜音、小林 敬、安達 修二 (京大農)
○Akane HORIE, Takashi KOBAYASHI, Shuji ADACHI (Kyoto Univ)

【緒言】イサダ（ツノナシオキアミ）は三陸特有の水産資源であるが，漁獲後の品質劣化が速く，アミン臭を生成する．そのため 10 万トン以上の資源量がありながら，ヒトの食用としての利用が限定されており，家畜や養殖の飼料として利用されている．我々は，生イサダやその蒸煮液を亜臨界水で処理することで，エビ風味の香味調味料として，食用に利用できる可能性を見いだした．さらに，イサダには機能性脂質や動物性タンパク質などの栄養素が含まれているため，これらを回収し，利用しようとする試みがなされている．有効成分を回収した後には，残渣となる溶液が大量に排出される．これらの残渣液を有効利用することができれば，イサダの全利用に向けた一歩となる．そこで，本研究では有効成分の抽出残渣液を亜臨界処理し，香味調味料を調製する方法について検討した．
【実験方法】残渣液 6.5 mL を 9 mL 容のステンレス製耐圧容器に入れて密封したのち，オイルバスに移した．120～200℃の所定温度に到達したのち 5 分間保持し，その後ただちに耐圧容器を氷中で 10℃以下まで冷却した．処理液を 4℃，$8.9\times10^3$ rpm で 15 分間遠心し，上清と沈殿に分離した．沈殿はほとんど析出しなかったため，上清について pH，Brix，塩分濃度，凝固点降下度，固形分濃度，灰分，吸光スペクトル，抗酸化活性，タンパク質量，および臭気強度を測定した．また，臭気嗜好度，生臭さ，腐敗臭，焦げ臭，香ばしさ，およびエビ風味の 6 項目について官能評価した．臭気嗜好度は－2（嫌い）～＋2（好き）点の 5 段階で評価し，他の 5 項目に関しては，それぞれ 0（全く感じない）～4（強く感じる）点の 5 段階で評価した．被験者は 10~40 代の男女 20 名とした．
【結果と考察】pH，Brix，凝固点降下度，固形分濃度，および灰分は亜臨界処理の前後で大きな変化は認められなかった．抗酸化活性およびタンパク質濃度は 160℃以上で増加した．また，処理温度の増加とともに残渣液は薄い黄色から濃い褐色に変化した．そこで，200 倍希釈した上清の吸光スペクトルを測定したところ, ピーク波長の変化が見られ, 何らかの反応が起きたことが示唆された. また，亜臨界処理を行うことにより臭気強度および嗜好度が増加した．180℃以下では処理温度の増加とともに香ばしさおよびエビ風味が増強されたが，200℃では臭気強度が大きくなり，生臭さおよび焦げ臭も強くなった．
【謝辞】本研究は，革新的技術開発・緊急展開事業（うち地域戦略プロジェクト）の「イサダを全利用した高付加価値素材の効率的生産体系構築」の一部として実施した．

subcritical water, Isada-krill, seasoning

講演番号：4B10a01
講演日時：3 月 20 日 09:20～ B 校舎 10 会場

# NFκB 転写活性を抑制する食品成分の探索・解析

Analysis of food components which suppress NFκB activity

○本田 瑞希、相田 美緒、薩 秀夫（前工大工）
○Mizuki Honda, Mio Aida, Hideo Satsu (Maebashi Inst. Tech.)

【目的】近年食生活の欧米化に伴って消化器疾患、中でも炎症性腸疾患の患者数が急増しており、今後もその増加が懸念されている。炎症性腸疾患は潰瘍性大腸炎およびクローン病に大別されるが、明確な原因はわかっておらず、厚生労働省の定める特定難治性疾患、いわゆる難病とされている。演者らはこれまで食品成分による炎症性腸疾患の予防・改善作用について検討を進め、その結果抗炎症作用が期待される食品成分の作用メカニズムとして、炎症のマスターレギュレーターである転写因子 NFκB 阻害を見出してきた。さらに NFκB に焦点をあて、動物培養細胞を用いて NFκB 転写活性を安定に測定する評価系を構築し、昨年度の本大会で報告した。そこで本研究では、構築した NFκB 転写活性安定評価系を用いて、NFκB 転写活性を抑制する食品成分の探索・解析を進めることとした。
【方法】NFκB 依存的な転写活性の評価系として、ルシフェラーゼ遺伝子上流に NFκB 応答配列を含むレポーターベクターを HeLa 細胞に安定に遺伝子導入した細胞株を用いることとした。NFκB 転写活性を亢進することが知られる炎症性サイトカイン TNF-α と各種食品成分を同時に細胞に添加し、37℃で 4 時間インキュベートした後、ルシフェラーゼ活性を測定した。また NFκB の標的遺伝子として炎症性ケモカインであるインターロイキン 8(IL-8)に注目し、IL-8 を発現することが知られる腸管上皮モデル Caco-2 細胞を用いて食品成分が IL-8 の mRNA 発現量に及ぼす影響を検討した。Caco-2 細胞に食品成分と TNF-α を添加して 37℃でインキュベートした後、RNA を回収し real-time PCR にて IL-8 の mRNA 発現量を測定した。
【結果】およそ 40 種類の食品成分を用いて、NFκB 転写活性を抑制する食品成分の探索をおこなった結果、フラボノイドの一種であるフィセチンが TNF-α によって亢進された NFκB 転写活性を抑制することを見出した。また添加するフィセチンの濃度を変えて検討したところ、添加したフィセチンの濃度依存的に NFκB 転写活性が抑制されることが確認された。そこで次に Caco-2 細胞に TNF-α とフィセチンを添加することで IL-8 mRNA 発現量への影響を検討した結果、TNF-α による IL-8 mRNA 発現量の亢進がフィセチン添加によって有意に抑制された。これより、フィセチンは TNF-α により亢進される NFκB 転写活性および IL-8 mRNA 発現亢進を抑制することが示された。現在、その他の食品成分についても解析を進めている。

なお本研究の一部は，総合科学技術・イノベーション会議のSIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施されました。

NFκB, anti-inflammation, fisetin

講演番号：4B10a02
講演日時：3 月 20 日 09:35～ B 校舎 10 会場

マスト細胞活性化反応に対する短鎖脂肪酸の抑制効果
Inhibition of mast cell-mediated allergic response by SCFA
○藤垣 泉、笠倉 和巳、八代 拓也、西山 千春（東理大・基礎工）
○Izumi FUJIGAKI, Kazumi KASAKURA, Takuya YASHIRO, Chiharu NISHIYAMA (Tokyo Univ. of Sci.)

[目的] 腸管に生息している腸内細菌や、その代謝産物がアレルギーの病態に関わっていることが報告されており、腸内環境を整えることによる予防・治療法に期待が高まっている。特に、腸内細菌が食物繊維を代謝して産生する短鎖脂肪酸 (Short-chain fatty acid; SCFA)には、腸管上皮細胞のエネルギー源になることや、免疫寛容に働く制御性 T 細胞の分化を誘導することが知られている。一方、食物アレルギーなど I 型アレルギーの責任細胞であるマスト細胞に SCFA が与える影響は不明である。そこで、本研究では、SCFA がマスト細胞の機能に及ぼす作用とその機序を明らかにすることを目的とした。
[方法・結果] マウス骨髄由来培養マスト細胞 (BMMC)を 6 種の SCFA (Acetate、Butyrate、Isobutyrate、Propionate、Valerate、Isovalerate)存在下で 48 時間処培養し、その後、IgE と抗原刺激による脱顆粒反応をβ-hexosaminidase assay で測定した。その結果、Acetate 以外の SCFA で抑制作用が認められた。そこで、より強い抑制効果が認められた Butyrate と Valerate に焦点を当て、以下の通り解析を行った。IgE と抗原刺激によるサイトカイン産生を ELISA で測定したところ、これら 2 種類の SCFA はともに IL-13 産生を低下させることが判明した。一方、TNF-α産生は Butyrate により亢進、Valerate により抑制され、Butyrate と Valerate の作用機構に相違がある可能性が示された。SCFA の作用点を明らかにするため、SCFA の受容体として知られている GPR41、GPR43、GPR109a と SCFA 輸送体である MCT1、MCT2 の mRNA 量を定量的 RT-PCR で測定し、これら遺伝子がマスト細胞に発現することを確認した。そこで、GPR 阻害剤 (Pertussis toxin; PTX)や、MCT 阻害剤 (α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid; α-CHCA)の存在下で、BMMC を SCFA 処理し、IgE と抗原刺激による脱顆粒反応を測定した。その結果、PTX 添加条件下で、Butyrate と Valerate による脱顆粒反応の抑制効果が打ち消され、一方、α-CHCA は、Butyrate と Valerate による脱顆粒反応の抑制に影響を及ぼさなかった。これらの結果から、Butyrate 及び Valerate が GPR を介してマスト細胞に作用し、マスト細胞の活性化反応を抑制することが示唆される。
[まとめ] 本研究により、Butyrate や Valerate が GPR を介してマスト細胞の活性化に影響を及ぼすことが示唆された。特に Valerate は脱顆粒反応、サイトカイン産生共に抑制していたことから、即時型、遅延型いずれの反応に対しても抑制効果があると判断され、I 型アレルギーの症状を緩和する可能性が期待される。

short-chain fatty acid, mast cell, allergy

発表責任者：西山 千春（chinishi@rs.tus.ac.jp）

講演番号：4B10a03
講演日時：3 月 20 日 09:50～ B 校舎 10 会場

新規非タンパク性アミノ酸 DADH による免疫抑制作用
Immunosuppressive effect of a novel non-proteinogenic amino acid, DADH
○関本 崇宏[1]、八代 拓也[1]、長谷部 文人[2]、松田 研一[2]、笠倉 和巳[1]、西山 真[2]、西山 千春[1] ([1]東理大・基礎工、[2]東大・生物生産工学研究センター)
○Takahiro SEKIMOTO[1], Takuya YASHIRO[1], Fumihito HASEBE[2], Kenichi MATSUDA[2], Kazumi KASAKURA[1], Makoto NISHIYAMA[2], Chiharu NISIYAMA[1] ([1]Tokyo Univ. of Sci., [2]Biotechnol. Res. Ctr., Univ. Tokyo)

放線菌の二次代謝産物から免疫抑制剤タクロリムスや抗結核薬ストレプトマイシンなど、特徴的な生理活性を有する物質が見出されてきている。ごく最近、放線菌 *Streptomyces*.sp SANK 60404 株より非タンパク性アミノ酸(2S,6R) -diamino-(5R,7)-dihydroxy-heptanoic acid (DADH)が単離された。DADH は免疫抑制剤として多発性硬化症の治療に利用される Fingolimod (FTY720)の薬理効果に重要な構造である 2-アミノ-1,3-プロパンジオール構造を有している。免疫応答において司令塔としての役割を担う白血球である樹状細胞(dendritic cells: DC) は TLR などを介して異物を認識すると、自身が活性化すると同時に、MHC class II を介した抗原提示によりリンパ球 T 細胞を活性化させることで適応免疫を誘導する。本研究では自己免疫疾患の発症や病態に関わる樹状細胞と T 細胞の免疫応答に対する DADH の効果を調べることを目的とした。

BALB/c マウスの骨髄細胞を Granulocyte macrophage colony-stimulating factor 存在下で培養することで Born marrow-derived DC (BMDC)を作製した。この BMDC と C57BL/6 マウスの脾臓由来 Pan T 細胞との共培養を行い BrdU assay を用いてアロジェニック反応による細胞増殖能の測定を行った結果、DADH 添加条件下で有意に T 細胞の増殖が抑制された。このことから、DADH は DC もしくは T 細胞に作用して T 細胞の増殖を抑制することが示唆された。続いて DC への作用を確認するために BMDC を DADH 存在下で培養、洗浄後 T 細胞と共培養を行ったところ細胞増殖が抑制されることが判明した。この時、フローサイトメトリーによる解析から CD8 陽性 T 細胞数が有意に減少していることが確認された。一方、T 細胞に対する DADH の直接的作用を評価するため抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体を用い T 細胞を刺激した際の細胞増殖を調べた。その結果、Pan T 細胞、CD4 陽性 Naïve T 細胞共に DADH により細胞増殖が抑制されることが明らかとなった。以上のことより DADH は樹状細胞と T 細胞のどちらにも作用して T 細胞活性化を抑制していることが示唆された。現在はこれらの作用機序について検討を行っている。

dendritic cells, T cells, natural products

講演番号：4B10a04
講演日時：3 月 20 日 10:05～ B 校舎 10 会場

新規アミノ酸 DADH によるマスト細胞の活性抑制
Suppressive effect of a novel amino acid DADH on activation of mast cells.
○白井 智丈[1]、笠倉 和巳[1]、長谷部 文人[2]、松田 研一[2]、八代 拓也[1]、西山 真[2]、西山 千春[1]([1]東理大・基礎工、[2]東大・生セ)
○Tomohiro SHIRAI[1], Kazumi KASAKURA[1], Fumihito HASEBE[2], Kenichi MATSUDA[2], Takuya YASHIRO[1], Makoto NISHIYAMA[2], Chiharu NISHIYAMA[1] ([1]Tokyo Univ. of Sci., [2]Biotechnol. Res. Ctr.,Univ. Tokyo)

[背景・目的]マスト細胞は粘膜や結合組織に局在する白血球の一種であり、細胞表面に幹細胞増殖因子 (SCF)受容体 c-kit と高親和性 IgE 受容体 FcεRI を発現することを特徴とする。SCF はマスト細胞の分化誘導や活性化を促し、IgE は FcεRI に結合した状態で抗原結合することによりマスト細胞を活性化する。IgE を介した反応は寄生虫感染への生体防御を担う一方、花粉や食品成分に対する IgE 応答ではアレルギー反応が惹起される。現在、アレルギー治療薬の多くはマスト細胞活性化のいずれかのステップを抑制することから、マスト細胞活性化経路がアレルギー抑制の有効な標的であることが示されている。ごく最近、*Streptomyces* 属放線菌の新規代謝産物として(*2S*、*6R*)-diamino-(*5R*、7)-dihydroxy-heptanoic acid (DADH)が見出された。DADH は非タンパク質性の新規アミノ酸であり、シロイヌナズナに対する胚軸伸張抑制作用があることが確認されたが、動物に対する作用は全く不明である。DADH が持つアミノエタノール構造は免疫抑制剤 FTY720 に特徴的な構造である。FTY720 はリンパ球遊走の抑制を主たる生理作用点とした多発性硬化症の治療薬であるが、マスト細胞の活性化抑制によりアレルギー反応を制御することも報告されている。これらの背景から、本研究では DADH がマスト細胞の活性化に及ぼす効果について解析を行った。
[方法]C57BL/6 マウスの骨髄細胞を IL-3 含有培地で 5~7 週間培養して骨髄由来培養マスト細胞(BMMC)を得た。BMMC を DADH 添加条件下で 48 時間維持した後、細胞表面の FcεRI と c-kit の発現量を FACS にて解析した。同様に DADH 処理した BMMC を IgE と抗原で刺激し、培地中に放出される β-hexosaminidase の酵素活性を指標に脱顆粒反応の程度を評価し、産生されるサイトカインの mRNA とタンパク質をそれぞれ qPCR と ELISA にて測定した。
[結果]FACS の結果 DADH 処理を施した BMMC は対照群と同等の FcεRI と c-kit 発現を維持していることが判明した。DADH は IgE と抗原刺激による脱顆粒反応の程度にも影響を及ぼさなかった。一方、活性化刺激により誘導される炎症性サイトカイン TNF-α と IL-6、Th2 型サイトカイン IL-4 と IL-13 の mRNA 量が DADH 処理により減少した。これらのうち TNF-α と IL-13 については DADH 処理によりタンパク質放出量も抑制傾向にあることが確認された。これらの結果から、DADH には即時型反応への効果は認められなかったものの、遅発相反応や慢性炎症に繋がるサイトカイン産生を抑制することが明らかとなった。現在、DADH によるマスト細胞機能の制御機構を解明するため、異なる活性化条件を用いて DADH の効果を解析中である。

Allergy, Mast cells, Cytokine

発表責任者：西山千春（chinishi@rs.tus.ac.jp）

講演番号：4B10a05
講演日時：3 月 20 日 10:20～ B 校舎 10 会場

# 転写因子 PU.1 のアレルギー疾患治療標的としての有効性

The therapeutic efficacy of transcription factor PU.1 against allergic disease

○小田 祥人、笠倉 和巳、八代 拓也、西山 千春（東理大・基礎工）
○Yoshihito ODA, Kazumi KASAKURA, Takuya YASHIRO, Chiharu NISHIYAMA (Tokyo Univ. of Sci.)

【目的】花粉症や食物アレルギーは、アレルゲン特異的 IgE 抗体により IgE 受容体(FcεRI)を発現する白血球が活性化される所謂 I 型過敏反応に分類される。FcεRI は主にマスト細胞と好塩基球に発現しており、FcεRI に結合した IgE が抗原結合を介して架橋構造を形成することにより細胞活性化が引き起こされる。我々はこれまでに、転写因子 PU.1 がヒト FcεRI の遺伝子発現を正に制御することを報告してきた。本研究では、アレルギー疾患治療標的としての PU.1 の有効性を評価する為、細胞内シグナル伝達分子群の遺伝子発現における PU.1 の役割を解析し、PU.1 制御がアレルギー反応を抑制することを細胞レベル、マウス個体レベルで検証した。
【方法と結果】マウス骨髄由来培養マスト細胞（BMMC）に PU.1 siRNA を導入し IgE と抗原により細胞を活性化したところ、PU.1 ノックダウン細胞では対照群と比較してβ-hexosaminidase 活性や TNF-α産生が抑制された。この時、シグナル伝達に関わる分子の mRNA 発現量を qPCR にて調べた結果、FcεRI の直下に位置するキナーゼ分子 Syk の発現が有意に減少していることが判明した。Syk の遺伝子発現における PU.1 の機能は不明であったことからプロモーター解析を行った結果、PU.1 は Syk 遺伝子上の転写開始点直上に結合し転写調節することが明らかになった。更に、ヒトマスト細胞株 LAD2 を用いて同様に解析を行い、PU.1 がヒトマスト細胞において、SYK 遺伝子のプロモーターに結合し SYK 発現を正に制御していること、即ち、PU.1 により Syk 遺伝子の転写活性化がマウスとヒトに共通した仕組みであることを確認した。免疫調節剤 Pomalidomide は多発性骨髄腫の治療薬として用いられ、CD34+細胞の PU.1 発現を抑制することが知られている。そこで、マスト細胞における PU.1 発現やアレルギー応答に対する Pomalidomide の作用を解析した。Pomalidomide 存在下で培養した LAD2 では PU.1 と SYK のタンパク質発現量が減少していることが確認された。続いて生体のアレルギー反応を評価した。マウス C57BL/6 に Pomalidomide を一週間経口投与した後、静脈注射による IgE 感作を行い、抗原暴露に引き続いて起こる体温低下をモニタリングした結果、Pomalidomide 投与群では体温低下が有意に緩和されることが判明した。
【まとめ】以上、本研究では、PU.1 が Syk 遺伝子発現に重要な転写因子であることが明らかとなり、PU.1 がマスト細胞活性化抑制の有効な標的であること、並びに免疫調節剤 Pomalidomide にアレルギー反応抑制効果があることが示唆された。

allergy, mast cell, Pu.1

発表責任者：西山　千春（chinishi@rs.tus.ac.jp）

講演番号：4B10a06
講演日時：3 月 20 日 10:35～ B 校舎 10 会場

# イシモズクがショウジョウバエ遺伝子発現に与える影響：DNA マイクロアレイ解析

# Effect of a seaweed called "Ishimozuku" (Sphaerotrichia divaricata) on gene expression in Drosophila: a DNA microarray analysis

○中井 雄治、福田 覚、永長 一茂 (弘前大・食料研)
○Yuji Nakai, Satoru Fukuda, Kaz Nagaosa (IFS, Hirosaki Univ.)

【背景および目的】

イシモズク（*Sphaerotrichia divaricata*）は主として日本海沿岸に広く分布する褐藻で、アルギン酸やフコイダンなどの多糖類、フコキサンチンやβ-カロテンなどのカロテノイドを多く含有しているが、オキナワモズク（*Cladosiphon okamuranus*）に比べて知名度が低く、低利用なのが現状である。イシモズクに生理機能が見いだせれば、普及につなげることができる。そこで本研究では、イシモズクの生理機能を評価する目的で、ショウジョウバエをモデル生物として用い、遺伝子発現に及ぼす影響を DNA マイクロアレイで網羅的に解析した。

【方法】

羽化後 0 から 24 時間の雄ショウジョウバエを通常飼料で 6 から 7 日間飼育した後、24 時間の絶食を行った。その後、コントロール（通常飼料）：C 群、イシモズク凍結乾燥粉末を 0.5%含む通常飼料：S 群の 2 群に分け、24 時間飼育を行った。1 群あたりの個体数は 20 匹/バイアル、各群 4 バイアルで飼育を行い、1 バイアルの個体をまとめて ISOGEN II（ニッポンジーン）、RNeasy micro kit (QIAGEN)による RNA の抽出・精製を行った。精製 RNA より 3'IVT Plus Kit (Affymetrix)でターゲット調製を行い、GeneChip Drosophila Genome 2.0 Array(Affymetrix)にハイブリダイズし、DNA マイクロアレイデータを得た。その後、正規化、主成分分析、群間で発現が異なる遺伝子の選抜を行った。

【結果と考察】

24 時間の飼育においては、各群に顕著な表現型の差は認められなかった。DNA マイクロアレイデータを Factor Analysis for Robust Microarray Summarization (FARMS)法によって正規化後、主成分分析を行った。遺伝子発現プロファイル全体を第一主成分（寄与率 59.8%）と第二主成分（寄与率 16.6%）の二次元プロットで評価した結果、C 群と S 群はおおまかに異なるクラスタを形成した。このことから、ショウジョウバエの遺伝子発現に対してイシモズクは影響を与えることが考えられた。そこで、C 群と S 群の二群間比較を FARMS 法と相性のよい Rank products 法で行い、両群間で発現の異なる遺伝子を選抜した。現在、得られた発現変動遺伝子セットに特徴的な機能の解析を行っている。

Sphaerotrichia divaricata, Drosophila, DNA microarray

発表責任者：中井 雄治（yunakai@hirosaki-u.ac.jp）

講演番号：4B10a07
講演日時：3 月 20 日 11:00～ B 校舎 10 会場

# 食品機能性評価における活性値と作用機序の同時予測の可能性

# Simultaneous estimation of the effect and action mechanism: Application to food functionality evaluation

○永浜 清子、山森 一人、江藤 望、西山 和夫、水光 正仁、榊原 陽一（宮崎大院・農工総合）
○Kiyoko NAGAHAMA, Kunihito YAMAMORI, Nozomu ETO, Kazuo NISHIYAMA, Masahito SUIKO, Yoichi SAKAKIBARA (Interdiscip. Grad. Sch. of Agric. and Eng., Univ. of Miyazaki)

【目的】我々は以前の研究で、細胞内のマーカータンパク質発現パターンから人工ニューラルネットワークを用いて、同時に複数の体調調節機能の活性値を推定可能な評価法を開発した[1]。本研究では、この評価法を発展させるため、活性値を推定するだけでなく、同時にその作用機序も予測可能な評価法を構築することを目的とし拡張重み更新型自己組織化マップ（SOM）[2]の応用を検討した。

【方法】ヒト T 細胞白血病ウイルス（HTLV-1）感染細胞 MT2 の増殖抑制効果をモデルとして、活性値の推定と作用機序の予測を試みた。具体的方法としては、40 種類の食品成分、薬剤成分、ならびに宮崎県産農産品抽出物をヒト肝がん細胞 HepG2 に添加し、12 種類の細胞内のマーカータンパク質を ELISA により測定し、データベースを構築した。一方、同成分ならびに抽出物について、HTLV-1 感染細胞 MT2 の増殖抑制効果を WST-8 により測定し、活性値とした。得られた食品及び薬剤成分の結果を、実際に発生しうる実験誤差を模倣したホワイトノイズを付加してデータを合成し、学習用データセットとした。農産品抽出物の結果は、ノイズを付加せず、検証用データセットとした。学習には、拡張重み更新型 SOM を用い、学習用サンプルを学習させ、マーカータンパク質発現量に基づいて自己組織化を行わせつつ、重みの一つとしてタンパク質発現量に応じた活性値を獲得させた。

【結果・考察】作成した拡張重み更新型 SOM の信頼性評価のため、農産品抽出物と合成前の食品成分および薬剤データについて、推定値と既存法による実測値との比較を行った。その結果、実測値と同程度の数値を推定することに成功した。次に、得られた SOM の競合ノードが持つ活性値に対応する重みの値をマップにした。その結果、活性値により、いくつかのクラスターが形成されており、成分によるクラスターも形成されていた。さらに、活性の高い成分について文献検索情報を調べたところ、似たような作用機序を持つ成分どうしは、比較的近い位置にあった。また、文献情報を有する抽出物に関しては、その抽出物が割り当てられた競合ノードの近傍に、報告されている作用機序と似たような機序を示す成分が位置していた。以上の結果より、拡張重み更新型 SOM は活性値推定と作用機序予測に有用であることが示唆された。

[1] K. Nagahama et al (2011) *J. Agric. Food Chem*., 59 (16), 8575-8588
[2] 山森一人 他(2011) 情報処理学会論文誌 数理モデル化と応用 4(4), 69-80

self-organizing map, food functionality evaluation, action mechanism

発表責任者：永浜　清子（nagahama.kiyoko.w3@cc.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：4B10a08
講演日時：3 月 20 日 11:15～ B 校舎 10 会場

# 和食固有素材を用いた統合代謝動態応答プロファイリング評価システムの構築
# Novel assessment system of integrated metabolisms by Washoku intake

○嶋 秀明[1]、益田 静香[1]、伊達 康博[2,3]、篠 阿弥宇[2]、梶川 瑞穂[1]、井上 能博[1]、菊地 淳[2,3,4] ([1]昭和薬科、[2]理研 CSRS、[3]横市院・生医、[4]名大院・生命農)
○Hideaki SHIMA[1], Shizuka MASUDA[1], Yasuhiro DATE[2,3], Amiu SHINO[2], Mizuho KAJIKAWA[1], Yoshihiro INOUE[1], Jun KIKUCHI[2,3,4] ([1]SPU, [2]Riken CSRS, [3]YCU. Med. Life Sci, [4]Nagoya Univ. BioAgriSci.)

【背景と目的】
世界有数の長寿国である日本には和食文化が存在し、栄養バランスの点や特有の食材等が健康の維持・増進に寄与していると考えられている。一方、腸内細菌叢は食生活により多大な影響を受けることは周知の事実であるが、食生活の多様化とそれに応じた消化吸収に伴う代謝変動の関係性については不明な点が多く、有用な評価法も乏しいのが現状である。そこで本研究では、和食固有素材の成分評価と、これらの摂食による腸内細菌叢変動を含む体内環境に及ぼす影響を統合的に評価可能な生体応答評価法の構築を目的とした。

【方法】
和食固有素材であるワラビ・コゴミを一般的な方法で灰汁抜きし、凍結乾燥後に破砕したもの、およびこれらの構成成分であるセルロースを生理食塩水に懸濁させた。固形物懸濁液と生理食塩水投与群を設定し、週 3 回の経口強制給餌を 2 週間行った。給餌前・中・後それぞれ 2 週間で採取した糞便・尿・血液、およびワラビ・コゴミを NMR により含有成分を解析した。また、ELISA 法により、検体中の IgA・IgG 等の抗体量の解析をした。腸内細菌叢の変動については Miseq を用いて検討した。

【結果と考察】
和食固有素材中に含まれる低分子および細胞壁成分を NMR により網羅的に解析するとともに、それらを摂取した時の免疫応答および代謝応答を評価した。その結果、陰性対照群と和食固有素材投与群とで尿中成分に違いが生じることが確認された。これらの代謝変化は、摂食変化に伴う腸内細菌叢の変動、または食餌成分による生体の代謝変動の影響を受けている可能性が推測できる。糞便中代謝変動、和食固有素材中成分および腸内細菌叢との関係性について検討している。

Washoku, Metabolome, Profiling

発表責任者：嶋秀明（shima@ac.shoyaku.ac.jp）

講演番号：4B10a09
講演日時：3 月 20 日 11:30～ B 校舎 10 会場

放射性セシウムによる内部被ばくを防ぐ食品成分探索のための評価系
Evaluation system of cesium permeability for investigation of food factor inhibiting internal exposure to Cs-137

○保田 倫子、徳山 千佳、唐木 晋一郎、下位 香代子 (静岡県大食)
○Michiko YASUDA, Chika Tokuyama, Shin-Ichiro Karaki, Kayoko Shimoi (Univ. Shizuoka)

【目的】東日本大震災の際の原発事故による食品・飲料水の放射性セシウム(Cs)による汚染と内部被ばくは社会問題となり、現況でも放射能汚染を未然に防ぐ対策は勿論、ばく露時の健康被害を最小限に留めるための対策も極めて重要である。飲食物中の Cs は摂取後、消化管内において速やかに吸収された後に、血中に移行後に尿中に排泄されるが、一部は体内に蓄積、一部は腸管内に分泌され、再吸収、再分泌され便として排泄される。よって、放射性 Cs の体内への吸収を抑制し、消化管内への移行を促進する効果を持つ物質により、放射性 Cs の体外への排泄を促し内部被ばくを防ぐことが期待できる。本研究では、そのような物質を探索するために、ヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞(*in vitro*)、及びマウス空腸を装着した Ussing chamber(*ex vivo*)を用いて、Cs の腸管を介した透過についての新たな評価系の構築を試みた。また、Caco-2 細胞を用いた方法により、食品に含まれる機能性フラボノイドであるルチンとケルセチンについて、Cs の腸管を通した透過に及ぼす効果を評価した。【方法・結果】Caco-2 細胞は半透過性膜付きインサートを用いて腸管上皮様に分化させた後、Cs の腸管から体内、体内から腸管への移行の評価のために Apical(A)側もしくは Basolateral(B)側から CsCl 溶液(0、1.0、5.0 mM)を処理し、経時的に B 側もしくは A 側の培地を回収し、濃硝酸により灰化した後、ICP-MS により Cs 量を測定した。A から B、B から A、どちらの場合も、CsCl 処理 10 分後には移行が見られ、透過係数はそれぞれ、$6.59\times10^{-6}$～$1.08\times10^{-5}$ cm/s、$1.36\times10^{-5}$～$1.91\times10^{-5}$ cm/s(B から A)であった。また、プルシアンブルー1%および 10%処理により、Cs の透過抑制が確認できた。ルチンおよびケルセチン(50 μM)を A 側に処理した場合、ケルセチンは Cs の A から B への透過を有意に抑制し、ルチンは B から A への透過を促進する傾向が見られた。C57BL/6 マウスの空腸を Ussing chamber に装着し、粘膜側(M)もしくは漿膜側(S)に Cs(1 mM)を含む Krebs-Ringer 液を処理し、経時的に S 側および M 側のから溶液を回収し、上記と同様に Cs 量を測定した。透過係数は、$4.989\times10^{-5}$ cm/s(M から S)、$4.27\times10^{-5}$ cm/s(S から M)であった。【結論】Cs の体内への吸収を抑制し、消化管内への移行を促進する効果を持つ物質のスクリーニングのための、動物試験より比較的簡便な 2 つの評価系を構築した。Caco-2 細胞を用いた方法では、Cs の体内への吸収を抑制するために実用化されているプルシアンブルーの作用を確認すると共に、機能性フラボノイドにそれらの効果を見出した。当グループではこれまでに動物試験により、このような効果を持つ食品成分について検討してきたが、動物試験を行う前のスクリーニング、腸管での作用メカニズムの検討用として、これらの評価系は期待できる。

Cesium, Radiological protection, Quercetin

発表責任者：保田倫子（yasuda@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：4B10a10
講演日時：3 月 20 日 11:45～ B 校舎 10 会場

# 農産物中の健康機能性分の探索方法に関する検討

Search of the ingredient included in agricultural produce to which contribute healthily

○梅林 志浩（鳥取産技セ）
○Yukihiro UMEBAYASHI (tiit)

２０１５年にスタートした機能性表示食品制度では農産物への機能性表示が可能となり、「三ヶ日みかん」や「大豆もやし」が話題になった。２０１６年１１月時点においてサプリメント等の加工食品を含めた届出受理総数は約５００件に上り、そのうちポリフェノールなど植物の二次代謝産物を機能性関与成分とする商品が最も多く、全体の約３割を占めている。植物の二次代謝産物は、植物の成長や維持および生殖に直接関与しない有機化合物と定義されており、ポリフェノール類を始め、テルペノイド、硫黄化合物等に分類される無数の種類が存在し、ポリフェノールに分類されるフラボノイド類に限ってみても、現在明らかになっているものだけで数千種類に上る。このように多種多様な植物成分のうち、これまでに人の健康への寄与について注目され、詳細な研究がなされてきたものはほんの一部であり、植物中には未だ発見されていない健康機能成分が多数存在すると考えられている。当研究所ではこれまでに県内の農産物を中心に１００以上のサンプルを収集し、高速液体クロマトグラフ質量分析計等の測定機器を用いて含有成分データを蓄積する一方で、ｉｎ ｖｉｔｒｏでの機能性試験も平行して実施してきた。今回はこれらの測定データから統計解析手法等を用いた機能性関与成分の抽出法を検討したので報告する。

functional foods, metabolomics, multivariate analysis

講演番号：4B10a11
講演日時：3 月 20 日 12:00～ B 校舎 10 会場

稲発酵粗飼料用品種「たちすずか」中の糖の経時的変化とサイレージ発酵による影響
Effect of the temporal change and silage fermentation in sugar of the high sugar content rice cultivar 'Tachisuzuka'

○木村 俊之[1]、草 佳那子[2]、上垣 隆一[3]([1]農研機構食品研究部門、[2]農研機構中央農業研究センター、[3]農研機構動物衛生研究部門)
○Toshiyuki KIMURA[1], Kanako KUSA[2], Ryuichi UEGAKI[3] ([1]Food Research Institute, NARO, [2]Central Region Agricultural Research Center, NARO, [3]National Institute of Animal Health, NARO)

【目的】稲発酵粗飼料（イネ WCS）用品種の「たちすずか」（*Oryza sativa* L.）は、茎葉多収で未消化となる籾が少ない、またサイレージ発酵に必要な茎葉中の糖含量が極めて高い特性をもつ品種である[1)]。畜産農家の評価も高く、今後一層の普及が期待されている品種である。本発表では、「たちすずか」のサイレージ発酵（乳酸発酵）に重要な影響を与える遊離糖と、サイレージで保持されるべき栄養素であるデンプンの①材料草中の経時的変化、および②サイレージ発酵前後の変化を検討した。
【方法】2015 年に農研機構中央農業研究センター谷和原水田圃場（茨城県つくばみらい市）で栽培した「たちすずか」を供試した。①8 月 11 日、8 月 25 日、9 月 7 日、9 月 18 日、10 月 9 日、10 月 22 日、11 月 4 日、11 月 13 日、12 月 21 日に圃場中 3 か所から 2 株を地際 0.1 m の高さで刈り取った。刈取り後茎葉部および穂部に分け、20 mm 程度に細断、凍結乾燥後、粉砕し分析に使用した。②9 月 18 日（乳熟期）、10 月 9 日（黄熟期）、11 月 13 日（完熟期）については、上記裁断後の一部 200 g を真空包装用規格袋（アサヒパック飛竜）につめ、乳酸菌（*L. planturum* chikuso-1）を $10^5$ cfu/g になるように添加後、真空包装した。調製したサイレージは 25℃で保管し、60 日後に開封し、熱風乾燥後、粉砕し分析に使用した。遊離糖は HPLC 法、デンプンは酵素法で定量した。
【結果】①遊離糖は茎葉部において 4～12%DW、穂部では 1～3%DW であった。遊離糖組成はショ糖、グルコース、フラクトースから成り、ショ糖が主成分であった。茎葉部において経時的にショ糖含量が上昇し、グルコース、フラクト―ス含量はほぼ横ばいであった。9 月 18 日および 12 月 21 日は単糖（グルコース、フラクトース）含量が上昇した。デンプンは茎葉部において 3～21%DW で、10 月 22 日まで上昇し、その後は横ばいから微減となった。②サイレージ発酵により遊離糖はほぼ消化されたが、10 月 7 日および 11 月 4 日においては＜1%DW のグルコース、フラクトースが検出された。「たちすずか」は黄熟期以降 30%DW を超える糖含量を有した。
当日は窒素施肥の影響、サイレージ品質についても紹介する。

1) Matsushita K, Iida S, Ideta O, Sunohara Y, Maeda H, Tamura Y, Kouno S, Takakuwa M ‘Tachisuzuká, a new rice cultivar with high straw yield and high sugar content for whole-crop silage use. *Breeding Sci.* 61, 86-92 (2011)

Tachisuzuka, temporal changes in sugar, silage fermentaion

発表責任者：木村俊之（kmr@affrc.go.jp）

講演番号：4B10a12
講演日時：3 月 20 日 12:15～ B 校舎 10 会場

# 穀類に含まれるオリザノール様成分（ステリルフェルレイト）の研究

# Study of oryzanol-like components (steryl ferulates) contained in cereals

○都築 和香子[1]、茂櫛 裕之[2]、川原 修司[3]、小竹 英一[1]、今場 司朗[1]、金井 良和[1]、堀金 彰[1]([1]農研機構食品研究部門、[2]千葉製粉（株）、[3]横山製粉（株））
○Wakako TSUZUKI[1], Hiroyuki MOGUSHI[2], Shuuji KAWAHARA[3], Eiichi KOTAKE[1], Shiro KOMBA[1], Yoshikazu KANAI[1], Akira HORIGANE[1] ([1]NARO Food Research Institute, [2]Chiba Flour Milling Co., Ltd., [3]YOKOYAMA FLOUR MILLING CO., LTD.)

（緒言）コメヌカに含まれるオリザノール（γオリザノール）は、ファイトケミカルの一種で、フェルラ酸に各種の植物ステロールまたは、トリテルペンアルコールがエステル結合した化合物の総称（以下、便宜的にステリルフェルレイト、SF と略）である。オリザノールは、植物内では生体防御反応に関与しているといわれているが、ヒトに対する生理機能性も詳細に調べられている。オリザノールは、1995 年に食品添加物として認められ、すでに抗酸化剤として食品や化粧品に使用されている。また、オリザノールは、高脂血症薬や向精神薬、中枢作動薬等の医薬品にも導入されている。1954 年に、コメヌカ油からオリザノールが見つけられたときは、単一物質と考えられていたが、現在までにオリザノールには、ステロール/トリテルペンアルコール部分の分子構造の異なる２４種類の分子種が同定されている。このオリザノールと同様の化合物 SF は、小麦やライ麦等にも含まれていることが報告されているが、日本では, コメが主食であることからあまり利用されていない。本研究においては、コムギフスマ等副産物の有効利用による国産農産物の高付加価値化を目的として、コメを含めた各種穀類の SF の含有量や局在化について調べた。

（方法）国産玄米、国産玄麦、輸入玄麦、ライ玄麦、大麦玄麦等の各種穀類より、SF 分画を抽出し、逆相 HPLC-UV 法で定量した。HPLC 法で分離された SF 分画は、LTQ-Orbitrap velos を用いた APCI-MS 法により、SF 分子種の分子構造を決定した。玄米については、精米工程で分離できる胚芽米や胚芽、白米に含まれる SF を分析した。玄麦については、テストミルで１４分画に製粉した後、各分画の SF 含量を分析し、SF の局在化についても調べた。

（結果）国産玄米、国産玄麦、ライ麦にふくまれるＳＦ含量は、それぞれ、35.7mg/100g 粒、13.2mg/100g 粒および 5.5mg/100g 粒であった。米のオリザノールの主要な分子種は、24-メチレンシクロアルタニルフェルレイト、シクロアルテニルフェルレイト、カンペステリルフェルレイト、および β-シトステリルフェルレイトであるが、国産玄麦に含まれる主要な SF は、カンペルテリルフェルレイト、カンペスタニルフェルレイトおよびシトスタニルフェルレイトであり、ライ麦や輸入玄麦の SF の分子種組成比と類似していた。一方、市販小麦粉や白米の SF 含量は、非常に少なかった。米や小麦の各分画の SF 含量を比較したところ、コメヌカやコムギフスマに SF が局在することが示された。コムギフスマ分画の中には 100mg/100g 分画の SF 含量を有する分画もあり、これらの結果は、コメヌカ同様に、コムギフスマも SF の供給源として利用できることを示唆していた。

oryzanol, steryl ferulate, cereal

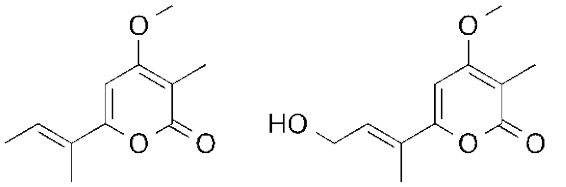
講演番号：4C11a01
講演日時：3 月 20 日 09:20～ C 校舎 11 会場

# イネいもち病菌のネクトリアピロン類の生産誘導条件の探索と大量生産株の作製

# Screening of the conditions for induced production of nectriapyrones of the rice blast fungus and construction of overproducing strains

○本山 高幸、田中 陽子、長田 裕之（理研 CSRS・ケミカルバイオロジー）
○Takayuki MOTOYAMA, Yoko TANAKA, Hiroyuki OSADA (Chem. Biol., RIKEN CSRS)

【目的】植物病原糸状菌であるイネいもち病菌 *Pyricularia oryzae*（Syn. *Magnaporthe oryzae*）のゲノム中には約 50 個の二次代謝遺伝子クラスターがあるが、生産物が報告されているのはメラニンの遺伝子クラスターのみであった。我々は、生産誘導条件を見出すことにより、ネクトリアピロン類、テヌアゾン酸、及びピリクロール類の生合成遺伝子クラスターを同定してきた。ネクトリアピロン類は二成分情報伝達系の撹乱により生産誘導させることが可能であり、現在までに nectriapyrone（**1**）及び水酸化類縁体である hydroxynectriapyrone（**2**）を同定している。生合成の鍵遺伝子はポリケタイド合成酵素遺伝子 *MGG_00806* であり、近傍にあるメチル化酵素遺伝子 *MGG_14657* が生合成に関与することを見出していた。**1** は、エンドファイト（植物内生菌）や植物病原菌を主とした様々な糸状菌が生産する化合物として知られるが、その生理作用は不明である。今回、生理活性評価に必要な化合物を取得するため、二成分情報伝達系の撹乱以外の生産誘導条件を探索するとともに、強力なプロモーターを用いた生合成遺伝子の大量発現によるネクトリアピロン類の大量生産を行った。




【方法と結果】二つの MAPK（Mitogen-activated Protein Kinase）遺伝子（*PMK1*、*MPS1*）の遺伝子破壊株及び大量発現株を作製し解析したところ、*PMK1* の破壊株で生産誘導が認められた。ネクトリアピロン類は二成分情報伝達系撹乱以外の条件でも生産誘導されることが明らかになったが、生産量が十分ではなかったため、プロモーター交換による大量発現を行うことにした。まず、二成分情報伝達系因子の破壊株を用いて、*MGG_00806* の近傍にある酸化酵素遺伝子（*MGG_00805*）等の破壊株を作製したが、これらは **1** 及び **2** の生産能を保持していた。この結果から、生合成遺伝子クラスターは 2 遺伝子からなり。**2** の生産に関わる酸化酵素遺伝子はクラスターの外に存在することが示唆された。*Aspergillus oryzae* の *TEF1* プロモーターを用いた *MGG_00806* の大量発現株では **1** の脱メチル化体と推定される化合物が大量生産された。更に、イネいもち病菌の *TEF1* プロモーターを用いて *MGG_14657* を大量発現させることにより、**1** と **2** が大量生産されることを見出した。この株では、**1** と **2** 以外のネクトリアピロン類と推定される化合物の生産も認められた。

本研究の一部は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業による支援を受けた。

Pyricularia oryzae, Secondary metabolism, Polyketide

講演番号：4C11a02
講演日時：3 月 20 日 09:35～ C 校舎 11 会場

# イネいもち病菌におけるかび毒テヌアゾン酸の生産制御機構

# Regulation mechanism of mycotoxin tenuazonic acid production in *Pyricularia oryzae*

○尹 忠銖、本山 高幸、長田 裕之（理研 CSRS・ケミカルバイオロジー）
○ChoongSoo YUN, Takayuki MOTOYAMA, Hiroyuki OSADA (Chem. Biol., RIKEN CSRS)

【背景及び目的】テヌアゾン酸はかび毒の一種であり、タンパク質合成阻害活性、抗腫瘍活性などの生理作用が報告されている。*Pyricularia oryzae*（イネいもち病菌）や *Alternaria* sp.などの植物病原糸状菌からその生産が報告され、これらの植物病原糸状菌に汚染された穀物、果物、野菜からの検出も報告されてきた。我々は前回の大会で、今まで不明であったテヌアゾン酸の生合成遺伝子を *P. oryzae* を用いて同定することに成功し、テヌアゾン酸の生合成機構を明らかにしたことを報告した。一方、糸状菌の中でテヌアゾン酸生産がどのように制御されているかについては不明であった。今回、*P. oryzae* におけるテヌアゾン酸の生産制御メカニズムの一部を明らかにしたので報告する。

【方法と結果】*P. oryzae* 北 1 株は通常の培養条件でテヌアゾン酸を生産しないが、DMSO 処理と二成分情報伝達系下流で働く p38 MAP キナーゼ OSM1 の遺伝子破壊によりテヌアゾン酸の生産が誘導されることを我々は報告した [1)]。*P. oryzae* のゲノム解析により、テヌアゾン酸生合成遺伝子(*TAS1*)の上流領域で $Zn(II)_2$-$Cys_6$ 型転写因子をコードすると予想される遺伝子(*MGG_07800*)を見出した。この遺伝子を破壊した株では、DMSO 添加によるテヌアゾン酸の生産誘導が起こらなくなったことから、MGG_07800 がテヌアゾン酸特異的転写因子であることが示唆された。また、糸状菌において二次代謝制御因子として知られる LaeA のオルソログである LAE1 (MGG_01233)の遺伝子破壊株では DMSO 添加によるテヌアゾン酸の生産誘導が起こらなくなり、過剰発現株では DMSO なしでもテヌアゾン酸の生産が誘導された。LAE1 と MGG_07800 の作用の位置関係を調べるため *LAE1* 過剰発現株に対して *MGG_07800* を破壊した二重変異株を作製したところ、テヌアゾン酸の生産誘導が起こらなくなったことから、LAE1 の下流で MGG_07800 が働いていることが示唆された。また、p38 MAP キナーゼ OSM1 の遺伝子破壊株において *LAE1* を破壊した二重変異株を作製し解析したところ、テヌアゾン酸の生産誘導が起こらなくなった。以上の結果から、*P. oryzae* においてテヌアゾン酸の生産制御は LAE1 とその下流の MGG_07800 を介して行われていることが示唆された。

本研究の一部は，農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業による支援を受けた。

1) Yun et al. 2015. Biosynthesis of the mycotoxin tenuazonic acid by a fungal NRPS-PKS hybrid enzyme. *Nat. com mun*. 6:8758. doi: 10.1038/ncomms9758.

tenuazonic acid, P. oryzae, secondary metabolite

講演番号：4C11a03
講演日時：3 月 20 日 09:50～ C 校舎 11 会場

# イネいもち病菌におけるピリクロール類生合成に関わる FAD 依存性モノオキシゲナーゼ遺伝子の解析

# Analysis of an FAD-dependent monooxygenase gene involved in pyriculol biosynthesis

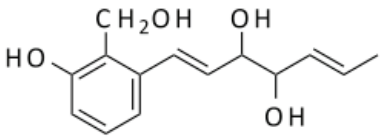
○古山 祐貴[1,2]、本山 高幸[1]、野川 俊彦[1]、鎌倉 高志[2]、長田 裕之[1] ([1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[2]東理大院理工・応生)
○Yuuki FURUYAMA[1,2], Takayuki MOTOYAMA[1], Toshihiko NOGAWA[1], Takashi KAMAKURA[2], Hiroyuki OSADA[1] ([1]Chem. Biol., RIKEN CSRS, [2]Tokyo Univ. of Sci.)

【目的】

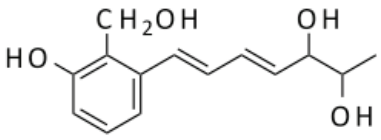
Pyriculol 類（pyriculol 及び dihydropyriculol 等の類縁体）は植物病原糸状菌であるイネいもち病菌 *Pyricularia oryzae*（*Magnaporthe oryzae*）が生産するポリケタイド化合物である。Pyriculol はイネに壊死斑を形成させる活性を持ち、病原性との関連が示唆されている。昨年度の大会において、pyriculol 類生合成に関与する遺伝子クラスターを見出したこと、クラスター内のポリケタイド合成酵素（PKS）遺伝子を破壊すると pyriculol 類の生産が見られなくなったことを報告した。この遺伝子クラスターは約 10 個の遺伝子により形成されている。また、高い相同性を示す遺伝子クラスターが *Neurospora crassa* に存在しており、*MGG_15114* ホモログを破壊すると子実体形成に異常が見られることが報告されている（Nowrousian 2009)。今回、イネいもち病菌においてフラビンアデノシンジヌクレオチド（FAD）依存性モノオキシゲナーゼ遺伝子である *MGG_15114* の遺伝子破壊を行った。その結果、pyriculol 類の生産に顕著な変化が見られたので報告する。

【方法と結果】

*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation（ATMT）法を用いた二回相同組み換えにより、*MGG_15114* 遺伝子破壊株を作製した。この破壊株と野生株を 0.1%agar を添加した PDB 液体培地において振とう培養した。その結果、野生株では dihydropyriculol（**1**）の生産が見られたが、*MGG_15114* 破壊株では **1** ではなく dihydropyricullariol（**2**）の生産が見られた。Pyriculol 類生合成遺伝子クラスターには *MGG_15114* を含め三つの FAD 依存性モノオキシゲナーゼ遺伝子が存在している。*MGG_15114* 遺伝子破壊では **1** の生産に顕著な影響が見られたが、ほか二つのモノオキシゲナーゼ遺伝子では破壊しても **1** の生産には *MGG_15114* 破壊ほどの顕著な影響は見られなかった。このことから *MGG_15114* が **1** の生産に関与していることが示唆された。また、残り二つのモノオキシゲナーゼ遺伝子が **2** などの他の類縁体の生産に関与していることが予想される。



Dihydropyriculol (**1**)



Dihydropyricullariol (**2**)

Pyricularia oryzae, Secondary metabolism, Polyketide

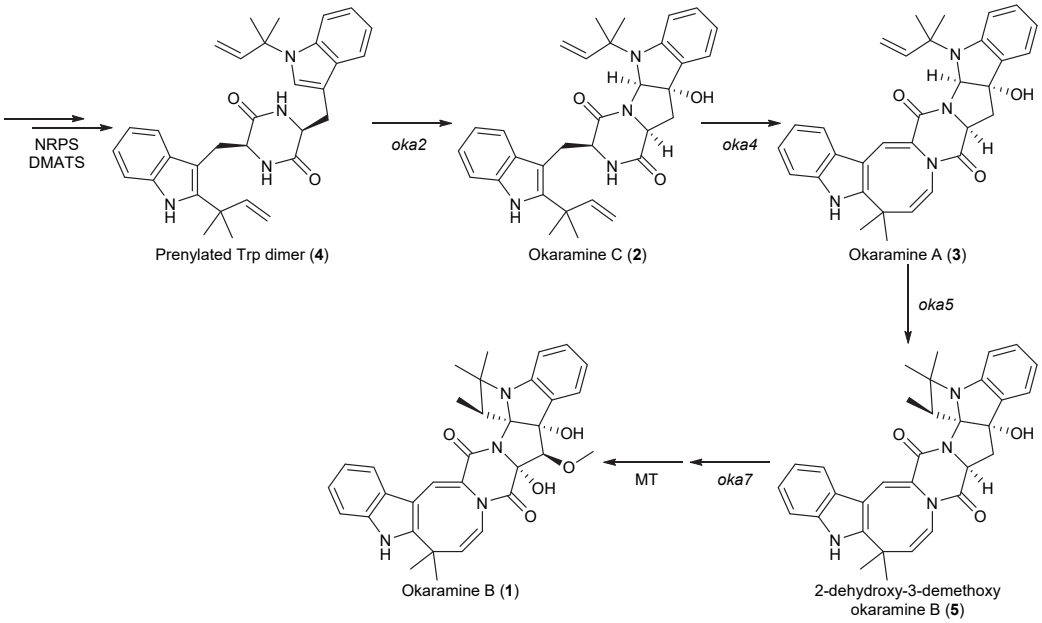
講演番号：4C11a04
講演日時：3 月 20 日 10:05～ C 校舎 11 会場

プレニル化インドールアルカロイド okaramine 生合成における azetidine 環合成酵素の同定
Identification of the enzyme responsible for azetidine formation in the okaramine biosynthetic pathway

○加藤 直樹[1]、大髙 潤之介[1]、衣笠 清美[1]、古谷 章悟[2]、高橋 俊二[1]、松田 一彦[2]、長田 裕之[1] ([1]理研 CSRS、[2]近畿大・農)
○Naoki KATO[1], Junnosuke Otaka[1], Kiyomi Kinugasa[1], Shogo Furutani[2], Shunji Takahashi[1], Kazuhiko Matsuda[2], Hiroyuki Osada[1] ([1]RIKEN CSRS, [2]Fac. of Agri., Kindai Univ.)

【目的】Okaramine は *Penicillium simplicissimum* AK-40 株より単離されたプレニル化インドールアルカロイド化合物であり、無脊椎動物にのみ存在する抑制性グルタミン酸受容体を標的分子とする。分子内に azocine（8 員環）と azetidine（4 員環）構造を有するユニークな多環性骨格は、化学者の注目を集めてきたが、azetidine 環を有する最も高活性な okaramine B（**1**）の全合成はなされていない。また、これまでに多くの糸状菌由来のプレニル化インドールアルカロイドについて生合成研究がなされてきたが、同様の環形成を担う遺伝子は知られていない。これまでに生合成経路の全容解明を目的として、*P. simplicissimum* AK-40 株のドラフトゲノム解読を行い、okaramine 生合成遺伝子クラスターの候補を見出している。今回は、環化酵素遺伝子の候補であるオキシゲナーゼ遺伝子を対象とした、ノックアウト実験と異宿主発現系を用いた解析結果について報告する。

【方法と結果】okaramine 遺伝子クラスターに含まれる 4 つのオキシゲナーゼ遺伝子について、遺伝子欠失株を作製し、それらの代謝物生産を LC/MS 分析により評価した。その結果、*oka4*、および *oka5* 欠失株では、それぞれ okaramine C（**2**）、okaramine A（**3**）の蓄積が認められた。Δ*oka2* 株、Δ*oka7* 株で主要に蓄積した代謝物については、分離精製し、各種 NMR 測定により、構造をそれぞれ、プレニル化トリプトファン二量体（**4**）、および 2-dehydroxy- 3-demethoxyokaramine B（**5**）と決定した。azetidine 環形成への関与が示唆されたα-ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ遺伝子 *oka5* について、現在、大腸菌発現系を用い、機能解析を行っている。




okaramine, indole alkaloid, azetidine

講演番号：4C11a05
講演日時：3 月 20 日 10:20～ C 校舎 11 会場

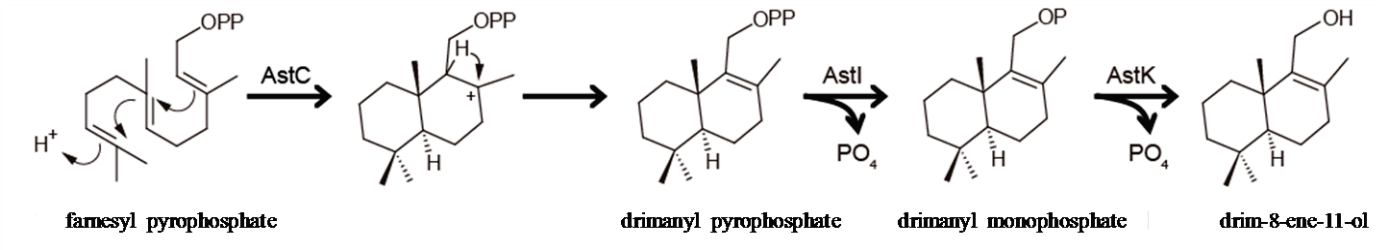
# 麹菌 *Aspergillus oryzae* が有する新奇セスキテルペン生合成経路の解明

# Identification of a novel sesquiterpene biosynthetic machinery in *Aspergillus oryzae*

○篠原 靖智[1]、高橋 俊二[2]、長田 裕之[2]、小山 泰二[1] ([1]野田産研、[2]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー)

○Yasutomo SHINOHARA[1], Shunji TAKAHASHI[2], Hiroyuki OSADA[2], Yasuji KOYAMA[1] ([1]NISR, [2]Chem. Biol., RIKEN CSRS)

Astellolides は、*Aspergillus* 属糸状菌が産生することが知られている二次代謝産物であり、ラクトン化したドリマン型セスキテルペンにアリール酸がエステル結合した構造を有する。我々は、これまでに *A. oryzae* の転写因子破壊株ライブラリーの代謝物解析から、astellolides 高生産株を見出すとともに、その生合成遺伝子クラスターを明らかにしている。本クラスターの構成遺伝子である *astC* は、既知のセスキテルペン環化酵素との相同性は示さないものの、その C 末端領域に Class II/type-B のテルペン環化活性ドメイン(DxDTT モチーフ)を保持していた。大腸菌を用いた組換え酵素 (AstC) と基質 farnesyl pyrophosphate を用いて反応解析を行ったところ、脱リン酸化反応を伴わずに drimanyl pyrophosphate を生成したことから、AstC は protonation によりセスキテルペンの環化反応を触媒している可能性が強く示唆された。また、astellolides 生合成遺伝子クラスターに drimanyl pyrophosphate の脱リン酸化を触媒する酵素がコードされている可能性が示唆された。そこで、脱リン酸化に寄与する酵素遺伝子の探索を行ったところ、本クラスターには、haloacid dehalogenase (HAD)-like hydrolase と機能推定される 2 つの遺伝子(*astI* および *astK*)が存在した。HAD-like hydrolase スーパーファミリーに属する多くの酵素が脱リン酸化活性を有し、その中にはイソプレンピロリン酸を基質とする酵素の報告があることから、AstI および AstK に脱リン酸化活性があると予測した。大腸菌を用いた組換え酵素を調製し、*in vitro* でその活性の検討を試みたところ、drimanyl pyrophosphate は AstI および AstK により段階的に脱リン酸化され、drim-8-ene-11-ol に変換された。以上の結果から、astellolides の基本骨格であるドリマン型セスキテルペンは、protonation による環化および段階的な脱リン酸化という 3 つの酵素反応からなる新しい経路によって生合成されることが明らかとなった。




sesquiterpene, astellolides, *Aspergillus oryzae*

講演番号：4C11a06
講演日時：3 月 20 日 10:35～ C 校舎 11 会場

# ショウジョウバエにおけるエクダイソン生合成過程での３位の還元反応の意義

# Significance of a reduction reaction at the C-3 position of a steroid during biosynthesis of ecdysone in Drosophila melanogaster

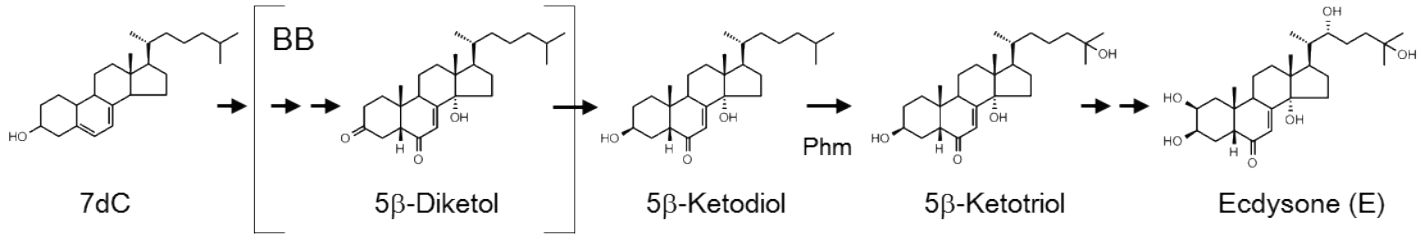
○小野 肇、齊藤 惇基、吉永 直子、森 直樹 (京大院農)
○Hajime ONO, Junki SAITO, Naoko YOSHINAGA, Naoki MORI (Kyoto Univ.)

（目的）

昆虫のステロイドホルモンの生合成において，脱皮ホルモン ecdysone (E) は前胸腺で cholesterol (C) から生合成される．C は 7-dehydrocholesterol (7dC) へと変換された後，5β-ketodiol に生合成されるが，この過程は反応経路が未解明のブラックボックス (BB) となっている．5β-Ketodiol は生合成酵素 Phantom (Phm) により 25 位が酸化されて 5β-ketotriol へ変換された後，E へと生合成される(図)．これまでに，BB 内で 7dC の 3 位の水酸基がカルボニルへ酸化された後，水酸基へ還元されることが明らかにされている．そのため，5β-ketodiol は 5β-diketol の 3 位のカルボニル基の還元により生成すると考えられている．E 生合成酵素の遺伝子発現を RNAi 法によりノックダウンしたショウジョウバエ幼虫は脱皮できずに 1 齢幼虫で死亡する．しかし，BB 内で機能していると考えられる *Cyp6t3*の遺伝子発現をノックダウンしたショウジョウバエ幼虫（*Cyp6t3*-RNAi 幼虫）は 2 齢まで発育した後に死亡するため，その原因を追究した．

（方法・結果）

*Cyp6t3*-RNAi 幼虫に 5β-ketodiol を摂食させると約 70%の個体が 3 齢へと脱皮した．しかし，5β-diketol を摂食させた場合，ほとんどの幼虫が 2 齢で死亡した．そのため，CYP6T3 は 5β-diketol の 5β-ketodiol への変換に必要であると考えられる．一方で，5β-ketotriol および E の 3 位が酸化された化合物を *Cyp6t3*-RNAi 幼虫に与えた場合，それぞれ約 90% および 40% の幼虫が 3 齢へと脱皮した．これより，*Cyp6t3*-RNAi 幼虫では，5β-ketodiol へ還元されなかった 5β-diketol が Phm によって酸化されにくいため 3 齢へ発育できなかったと考えられる.以上の結果より，ショウジョウバエでは，CYP6T3 の機能が欠損すると微量の E しか生合成できなくなるため，1 齢から 2 齢へ脱皮できても 3 齢へ脱皮できないと考えられる．3 齢脱皮に必要な量の E を生合成するために，CYP6T3 が 5β-diketol の 3 位を還元して Phm 活性の高い基質 5β-ketodiol を供給していることが示唆された.




Ecdysone, Biosynthesis, Drosophila melanogaster

発表責任者：小野　肇（onoono@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4C11a07
講演日時：3 月 20 日 11:00～ C 校舎 11 会場

クチナシ含有イリドイドに対するハスモンヨトウ幼虫の解毒機構
Detoxication mechanism of *Spodoptera litura* larvae to iridoid of *Gardenia jasminoides*
○岩井 崇晃、志野 真実子、内藤 裕彬、吉永 直子、森 直樹（京大院農）
○Takaaki IWAI, Mamiko SHINO, Hiroaki NAITOU, Naoko YOSHINAGA, Naoki MORI (Kyoto Univ.)

【背景・目的】アカネ科クチナシ *Gardenia jasminoides* の葉には, 昆虫の食害に対する防御物質としてイリドイド配糖体の gardenoside が多量に含まれている. クチナシの葉が食害されたとき, gardenoside は葉由来の β-glucosidase の作用を受け, gardenoside アグリコンが生成する. Gardenoside アグリコンには昆虫の生育阻害活性があることが報告されている. また, チョウ目ヤガ科ハスモンヨトウ *Spodoptera litura* 幼虫は クチナシ葉を摂食すると 腸管内に β-alanine を誘導し, gardenoside アグリコン と結合させることで無毒化を図る. しかし, β-alanine の誘導量が不十分であるために解毒が成功せず, 生育阻害を受けてしまう. 本研究ではハスモンヨトウ幼虫が腸管内に β-alanine を誘導するメカニズムについて探索した.

【方法・結果】ハスモンヨトウ幼虫にクチナシの葉を摂食させ, 2 時間後から 48 時間後にかけて腸管内容物及び各組織の β-alanine 量を測定した. 腸管内容物ではクチナシ摂食 12 時間後と 36 時間後に β-alanine の有意な増加を確認した. 一方で, 体液, 中腸組織, 及び脂肪体では摂食 36 時間後でのみ β-alanine が増加した. このことから, ハスモンヨトウには 2 段階での β-alanine 誘導機構が存在する可能性が示唆された.

クチナシ生葉, 葉中の β-glucosidase を失活させた加熱葉, 及び同量の gardenoside を含む寒天飼料をハスモンヨトウに 2 日間摂食させた. その結果, 加熱葉を摂食させた個体では生葉摂食個体と同様に β-alanine が誘導されたが, gardenoside を含む寒天飼料を摂食した個体では β-alanine 誘導量が低かった.

これらの結果を踏まえて, 本発表ではクチナシ葉に対してのハスモンヨトウの解毒代謝機構について考察する.

iridoid, *Gardenia jasminoides*, *Spodoptera litura*

発表責任者：岩井崇晃（chikuwa63@gmail.com）

講演番号：4C11a08
講演日時：3 月 20 日 11:15～ C 校舎 11 会場

# イネ（*Oryza sativa*）に対する酢酸処理による乾燥耐性付与に伴う代謝変化

# Metabolic changes in *Oryza sativa* associated with developing resistance to drought by acetic acid

○伊左治 俊策[1]、吉永 直子[1]、土生 芳樹[2]、森 直樹[1]（[1]京大農、[2]農研機構）
○Shunsaku ISAJI[1], Naoko YOSHINAGA[1], Yoshiki HABU[2], Naoki MORI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]NARO)

[背景と目的]

高温, 凍結など非生物的ストレスにさらされると, 植物は様々な遺伝子発現を変化させて, ストレスに対応しようとする. 近年, シロイヌナズナで乾燥ストレスに応答し酢酸を生合成する遺伝子が見つかった. 一方, 酢酸で処理したイネ (*Oryza sativa*) では, 乾燥耐性が付与されることが明らかになっている. また, 乾燥ストレスに面したダイズ, ゴマ, カブが 4 - アミノ酪酸 (以下 GABA) を蓄積することが報告されている. 本研究では, 酢酸処理がイネに与える影響をアミノ酸および有機酸代謝から調べた.

[方法と結果]

播種後 2 週間生育させたイネ (日本晴) の個体を水道水 (対照区) または酢酸水溶液 (30 mM, 処理区) で 4 日間生育させた. その後 4 日間乾燥ストレスを与え, 5 日間再吸水させたところ, 処理区では対照区に対し生存率が高かった.

酢酸処理したイネを 80% メタノール/水で抽出し, GABA を LC/MS で定量した. その結果, 根において GABA は酢酸処理後 1 日目に増加するのに対し, 地上部では酢酸処理開始後 3 日目に増加した. 現在, GABA の植物体中の蓄積と乾燥耐性付与の関連性に着目し, 実験を進めている.

また, 同様に, トリカルボン酸回路 (以下 TCA 回路) の有機酸についても LC/MS で定量した. TCA 回路の有機酸の挙動と GABA の蓄積について考察する.

Drought stress, gamma - aminobutyric acid (GABA), TCA cycle

発表責任者：伊左治俊策（isaji.shunsaku@gmail.com）

講演番号：4C11a09
講演日時：3 月 20 日 11:30～ C 校舎 11 会場

# *Blautia producta* ATCC27340 におけるリグナン *O*-デメチラーゼ候補遺伝子の探索

Screening of lignan *O*-demthylase candidate gene from *Blautia producta* ATCC27340

○久留 菜美[1]、鈴木 史朗[1]、内海 龍太郎[2]、梅澤 俊明[1] ([1]京都大学生存圏研究所、[2]近畿大院・農・バイオ)

○Nami HISADOME[1], Shiro SUZUKI[1], Ryutaro UTSUMI[2], Toshiaki UMEZAWA[1] ([1]Research Institute for Sustainable Humanosphere, Kyoto University, [2]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kinki Univ)

【目的】アマ種子などに多く含まれるリグナン配糖体 secoisolariciresinol diglucoside (SDG) は、ヒトなどの哺乳動物の腸内細菌により脱グルコシル化および芳香核上の置換基の修飾を受け、哺乳動物リグナンと呼ばれるリグナンに変換される。代表的な哺乳動物リグナンの enterodiol、enterolactone は、ファイトエストロゲンとしての活性を有しており、これまでに SDG を多量に含むアマ種子を多く摂取することで、乳癌発症リスクを低減することが知られている。本研究では、ゲノム情報が公開されているヒト腸内細菌 *Blautia producta* ATCC27340 が、secoisolariciresinol (SIR) および matairesinol (MR) の *O*-デメチル化を行うことを示すと共に、リグナンの芳香核メトキシ基の *O*-デメチル化を行う酵素（リグナン *O*-デメチラーゼ）遺伝子を、*B. producta* のゲノム配列情報を基に推定した。

【方法と結果】理化学研究所より入手した *B. producta* ATCC27340 を用いて、嫌気条件下における SIR あるいは MR 存在下での *B. producta* の液体培養を行った。培養液の有機溶媒抽出物の GC-MS 分析の結果より、SIR または MR のいずれにおいても *O*-デメチル化が行われていることを確認した。次に、文献検索およびパスウェイ検索を行うことにより、リグナン *O*-デメチラーゼがテトラヒドロ葉酸依存性 *O*-デメチラーゼの酵素ファミリーに属することが推定された。そこで、*B. producta* の全タンパク質配列に対し、既知のテトラヒドロ葉酸依存性 *O*-デメチラーゼおよび関連タンパク質が有するモチーフの検索を行うことによって、複数の候補タンパク質を見出した。これらの候補タンパク質と既知酵素について系統樹解析とホモロジー解析を行った。また、*B. producta* ゲノムへの候補タンパク質遺伝子のマッピングも行った。その結果、*B. producta* の腸内細菌のゲノム上で、芳香核 *O*-デメチラーゼの活性発現に必要と推定される全タンパク質遺伝子を含む一個のクラスターの存在が見出された。

lignan, *Blautia producta*, *O*-demethylase

講演番号：4C11a10
講演日時：3 月 20 日 11:45～ C 校舎 11 会場

昆虫におけるインドール酢酸の生合成に関する研究
Studies on biosynthesis of Indole-3-acetic acid in insects.
○横山 千晃[1]、永田 晋治[3]、上妻 由章[2]、鈴木 義人[2]([1]茨大院・農、[2]茨大・農、[3]東大院・新領域・先端生命)
○Chiaki YOKOYAMA[1], Shinji NAGATA[3], Yoshiaki KOUZUMA[2], Yoshihito SUZUKI[2] ([1]Ibaraki Univ., [2]Ibaraki.Univ., [3]Univ. of Tokyo)

【背景】
ある種の昆虫は摂食や産卵などの刺激により，宿主植物上でゴールと呼ばれる異常な植物組織を形成する。この現象にはゴール形成昆虫が生産するインドール酢酸（IAA）の関与が示唆されている。我々はゴール形成昆虫であるハバチと，ゴールを形成しないカイコが，トリプトファン（Trp），インドールアセトアルドキシム（IAOx），インドールアセトアルデヒド（IAAld）のいずれをも IAA へと変換すること，及びそれらの変換効率の比較から，Trp→IAOx→IAAld→IAA という共通の生合成経路を提唱した。また，カイコに比べてハバチでは Trp→IAOx の変換が強化されていることを示唆する結果が得られている。
一方で, Trp 代謝物としての IAOx や IAAld, また IAOx 代謝物としての IAAld が殆ど検出されず, また我々が取得した IAAld→IAA の阻害剤 IBI1 の存在下でも，それらの蓄積が認められないことから，上記生合成経路が完全に証明されたとは言えない状況であった。中間体化合物が検出されにくい原因として，IAA 生成に至らない代謝経路の存在や，各変換における反応速度の差から中間体が即座に代謝され，存在量が極めて低い等の可能性が考えられる。そこで，本研究ではこれらの点を明らかにし，上記 IAA 生合成経路の証拠を得ることを目的とした。

【方法・結果】
カイコ絹糸腺由来の酵素液に IAOx あるいは IAAld を投与し, 代謝物の探索を行った。インキュベート後，蛍光検出器（ex, 280 nm; em, 350 nm）を用いて HPLC 上で代謝物の確認を行った。IAOx からは IAA 以外の代謝物は同定されなかったが，IAAld からは阻害剤 IBI1 存在下で存在量の増加するピークを見出した。精製，単離後，NMR 等の機器分析により本代謝物をインドールエタノール（IEtOH）と同定した。また, 標識[$^{13}C_6$]IAOx の代謝物としても[$^{13}C_6$]IEtOH が検出された。さらに，阻害剤 IBI1 存在下では，[$^{13}C_6$]IAOx 由来の[$^{13}C_6$]IAA 量が減少し，[$^{13}C_6$]IEtOH が増加したが，その増減量がほぼ一致していた。この結果から，IBI1 を投与したことにより IAAld→IAA の変換が阻害され，その分の IAAld が IEtOH へ代謝されたと考えられる。この結果は，IBI1 存在下でも IAAld の蓄積が見られない原因を明らかにすると共に, IAOx→IAAld→IAA の経路の存在を強く支持するものである。

indole-3-acetic acid, gall, insect

講演番号：4C11a11
講演日時：3 月 20 日 12:00～ C 校舎 11 会場

# リンゴ実生における Phlorizin 類の生成と代謝に関する研究
# Study on biotransformation and metabolism of phlorizin in apple seedlings

○小山 愛美[1]、常盤野 哲生[2]、水野 幸一[2]、小森 貞男[3]、吉澤 結子[2]([1]秋田県立大生資科院、[2]秋田県立大生資科、[3]岩手大農)
○ Manami OYAMA[1], Tetsuo TOKIWANO[2], Koichi MIZUNO[2], Sadao KOMORI[3], Yuko YOSHIZAWA[2] ([1]Akita Pref. Univ. Grad. Sc., [2]Akita Pref. Univ., [3]Iwate Univ.)

【緒言】

Phlorizin は、リンゴの葉や果実に存在が認められるポリフェノール類で、抗酸化、抗炎症作用などが報告されている。当研究室で行っている、リンゴが産生するポリフェノール類の代謝研究の中で、リンゴ実生を用いた実験系においてエリシター処理をしたところ、phloretin が新生していることを見出した。そこで、その生成と代謝について詳細に検討した。

【実験方法】

実験材料をリンゴの実生とし、無菌状態において固体培地上で約 1 ヵ月間生育させた培養植物体(品種 : Starking delicious) を用いた。これを液体培地に移し、エリシター処理を施した。エリシターとして、2,6 -ジクロロイソニコチン酸を使用し、一定期間培養後、植物体と培地をそれぞれ有機溶媒で抽出し、未処理のコントロールと比較して、エリシター処理をした植物体あるいは培地中に含まれる成分について分析した。Phloretin の生成機構について考察するため、重水素標識体 ($[^2H_n]$ phlorizin 及び$[^2H_m]$ phloretin) を調製し、リンゴ実生における取り込み実験を行った。

【結果】

リンゴ実生ではエリシター未処理でも phlorizin が検出されるが、phloretin はほとんど検出されない。そこで、エリシター処理による phloretin の生成時期を確認するため、エリシター処理後 1 ～ 7 日間培養し、植物体と培地それぞれから抽出物を作製した。これを HPLC にて分析した結果、植物体では phloretin がエリシター処理 1 日目から検出されたが、培地ではエリシター処理 2 日目から検出された。新生した phloretin の由来を確認するため、phlorizin の重水素標識体 $[^2H_n]$ phlorizin を調製して、エリシター処理と共にリンゴ実生に添加し、7 日間培養した。その植物体の抽出物を LC-MS で分析した結果、$[^2H_x]$ phloretin を検出したことから、phlorizin が加水分解されたことが示唆された。また、$[^2H_m]$ phloretin も調製して同様に実生に添加したところ、$[^2H_y]$ phlorizin が検出されたことから、phloretin が配糖体化されて phlorizin に変換されていることが示唆された。

*Malus domestica*, Phloretin, Phlorizin

発表責任者：小山　愛美（D15G001@akita-pu.ac.jp）

講演番号：4C11a12
講演日時：3 月 20 日 12:15～ C 校舎 11 会場

# 傷害を受けたイネにおける isopentylamine の蓄積

# Accumulation of isopentylamine in cut-injured rice leaves

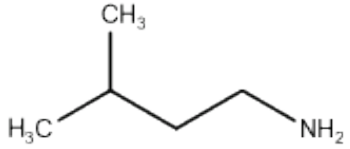
○加茂 万莉奈[1]、寺石 政義[2]、村山 哲也[1]、石原 亨[3]、奥本 裕[2]、森 直樹[2]、網干 貴子[1] ([1]山形大農、[2]京大院農、[3]鳥取大農)

○ MARINA KAMO[1], MASAYOSHI TERAISHI[2], TETSUYA MURAYAMA[1], ATSUSHI ISHIHARA[3], YUTAKA OKUMOTO[2], NAOKI MORI[2], TAKAKO ABOSHI[1] ([1]Yamagata Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Tottori Univ.)

植物からは様々な非タンパク性アミノ酸が報告されており、ornithine や homoserine など一次代謝で用いられるものの他に、canavanine や azetidine-2-carboxylic acid のように植食者や病原菌の生育を抑制するなどの生理活性を示すものがある。我々はこれまでに、植物ホルモンの jasmonic acid を噴霧したイネ幼苗 (日本晴) において、非タンパク性アミノ酸の β-tyrosine (β-Tyr) の蓄積が増加することを見出した。β-Tyr は、シロイヌナズナやタバコなどの双子葉植物の根の成長を抑制するアレロパシー活性を有する物質である。

本研究では、jasmonic acid 噴霧によりイネ葉中の量が変化する他のアミノ酸及びアミンを探索した。イネ幼苗に 1 mM jasmonic acid を噴霧し（1 日 2 回）、初回噴霧から 24 時間後のイネをメタノール中で破砕した。このメタノール抽出液に 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidylcarbamate (AQC) を加えて 55˚C で 10 分間誘導体化し (ホウ酸緩衝液 pH 8.8)、LC/MS で分析した。その結果、jasmonic acid 処理により保持時間 7.2 分に m/z 258 の物質（ESI positive）が増加することを見出した。m/z 値などから本物質を isopentylamine と推測し、標品を AQC 試薬で誘導体化後、LC/MS で同様に分析し、保持時間の一致を確認した。Isopentylamine は通常イネからはほとんど検出されないが、jasmonic acid 処理により葉で 3 μg/g (mean±SEM) 蓄積することが明らかとなった。Isopentylamine は、ケール、ルバーブ、トマト等に含まれる揮発性のアミンであるが、イネからの報告は我々が知る限りない。

また、葉に切り込みを入れて 24 時間が経過したイネ幼苗についても同様の分析を行ったところ、jasmonic acid を噴霧した時と同様に、葉で isopentylamine が蓄積した。切り込みを入れてから 3 時間後のイネ葉では isopentylamine がほとんど検出されなかったが、6 時間後以降は徐々に蓄積量が増加した。Isopentylamine は傷害により生合成が誘導されるが、傷害直後には増加せず、数時間の時間を要することが明らかとなった。さらに、葉に切り込みを入れた苗であっても、切り込みを入れなかった葉では isopentylamine が増加しなかったことから、isopentylamine は傷害部付近で蓄積することが示唆された。



Isopentylamine

O.sativa, isopentylamine, jasmonic acid

発表責任者：網干貴子（taboshi@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp）

講演番号：4C12a01
講演日時：3 月 20 日 09:20～ C 校舎 12 会場

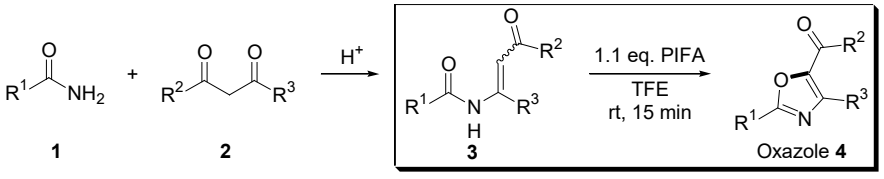
# エナミドの分子内酸化的カップリングによるオキサゾール誘導体の効率的合成

# A rapid access to substituted oxazoles via a Hypervalent Iodine-mediated oxidative cyclization of enamides

○神谷 緑、園田 素啓、谷森 紳治 (阪府大院生命環境)
○Midori KAMIYA, Motohiro SONODA, Sinzi TANIMORI (Osaka Pref. Univ.)

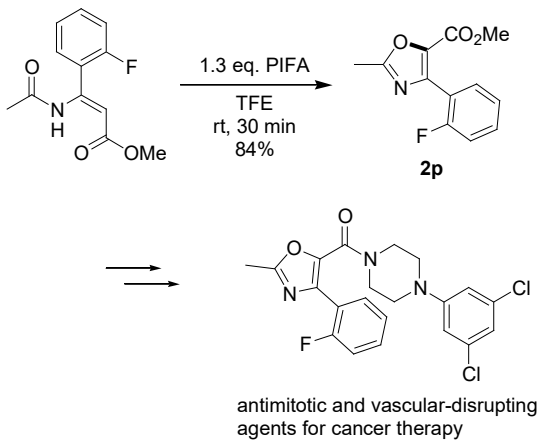
オキサゾールは、窒素ならびに酸素原子を環内に含む芳香族複素環化合物であり、その誘導体の中には抗 HIV、抗炎症などの生理活性を示すものが多いことから、重要な構造モチーフの一つとして知られている。しかし従来のオキサゾール合成法では、ハロゲン化物や高価な遷移金属を必要とする手法が多く、環境保護、ならびに経済性の観点から問題があった。そこで本研究ではこれらに配慮し、出発物質としてハロゲン化基質を使用せず、また、反応剤として安価な超原子価ヨウ素化合物を用いることにより、簡便で効率的なオキサゾール誘導体の合成法の開発を目的として検討を行った。

まず、オキサゾールの合成前駆体として、ベンズアミド **1a** とアセチルアセトン **2a** から容易に合成できるエナミド **3a** をモデル基質に用いオキサゾール合成の条件検討を行った。その結果、酸化剤に超原子価ヨウ素試薬である[ビス（トリフルオロアセトキシ）ヨード]ベンゼン（PIFA)、溶媒にトリフルオロエタノール(TFE)を用い室温にて 15 分間反応させた際に目的としたオキサゾール **4a** が 91%で得られた。次に、この反応の汎用性について調べるため合成した種々のエナミドに対し環化反応を検討したところ、中程度から高い収率で目的のオキサゾール体 **4** が得られた（Scheme 1)。さらに、直接的にオキサゾールを合成する目的で **1e** からのワンポット法を検討したところ、収率 63%で目的物 **4e** を効率よく合成することができた。また、本反応を利用した医薬品中間体の合成も行い、フッ素体 **2p** を 84%で合成することができた（Scheme 2)。現在は、反応条件の改良のためヨウ素試薬の触媒化を目指して検討中である。




$R^1$= Ph, $R^2$= $R^3$= Me (**4a**): 93%
$R^1$= Ph, $R^2$= $R^3$= Et (**4b**): 85%
$R^1$= Ph, $R^2$= $R^3$= $^i$Pr (**4c**): 85%
$R^1$= Ph, $R^2$= Ph, $R^3$= Me (**4d**): 98%
$R^1$= 3-Me-$C_6H_4$, $R^2$= $R^3$= Me (**4e**): 90%
$R^1$= 2-MeO-$C_6H_4$, $R^2$= Ph, $R^3$= Me (**4f**): 93%
$R^1$= 2-Br-$C_6H_4$, $R^2$= $R^3$= Et (**4g**): 90%
$R^1$= 3-CN-$C_6H_4$, $R^2$= $R^3$= Me (**4h**): 83%
$R^1$= 4-$NO_2$-$C_6H_4$, $R^2$= $R^3$= Et (**4i**): 92%
$R^1$= Me, $R^2$= Ph, $R^3$= Me (**4j**): 91%
$R^1$= $n$-$C_5H_{11}$, $R^2$= OMe, $R^3$= Me (**4k**): 62%
$R^1$= Cy, $R^2$= $R^3$= Me (**4l**): 82%
$R^1$= $^t$Bu, $R^2$= $R^3$= Me (**4m**): 85%
$R^1$= Ph, $R^2$= OMe, $R^3$= H (**4n**): 58%
$R^1$= Py, $R^2$= $R^3$= Me (**4o**): 75%

Scheme 1. エナミド体ならびにオキサゾール誘導体の合成




Scheme 2. 医薬品中間体の合成

Hypervalent Iodine, Oxazole, Transition-metal-free

講演番号：4C12a02
講演日時：3 月 20 日 09:35～ C 校舎 12 会場

# ボタンボウフウの生理活性成分イソサミジンの合成研究

# Synthetic studies of isosamidin isolated from *Peucedanum japonicum*

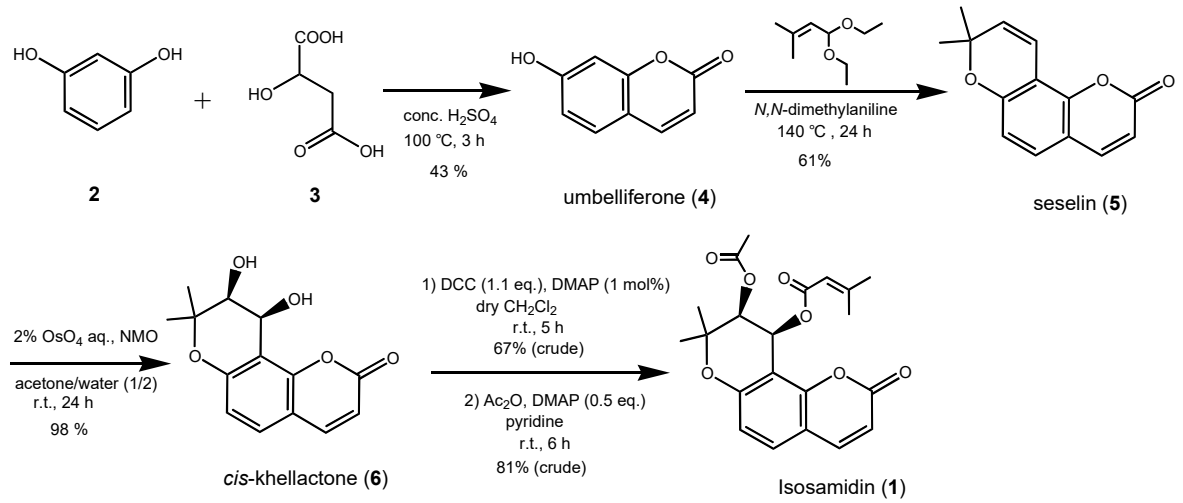
○木下 麻美、阪口 祐貴、赤川 貢、園田 素啓、谷森 紳治（阪府大院生命環境）
○Mami KINOSHITA, Yuki SAKAGUCHI, Mitsugu AKAGAWA, Motohiro SONODA, Shinji TANIMORI (Osaka Pref. Univ)

【緒言】

Isosamidin (**1**)は、沖縄や屋久島に自生するセリ科の植物、ボタンボウフウ（長命草）に含まれる天然物であり、排尿促進、血流改善などさまざまな生理活性があることがこれまでに報告されている。しかしながら、植物体からのアルコール抽出以外の調製法が確立されておらず、大量に入手することは困難である。そこで、本研究では isosamidin (**1**)を有機合成化学的手法による簡便な合成法を確立し、それを利用して様々なイソサミジン誘導体を合成することを目的に、isosamidin (**1**)の全合成経路の開発に取り組んだ。

【実験方法と結果】

文献法に従い、レゾルシノール **2** とリンゴ酸 **3** から調製した umbelliferone (**4**)と 1,1-ジエトキシー3－メチルー2－ブテンから、140 ℃、24 時間加熱還流を行い、seselin (**5**)を収率 61%で合成した。合成した seselin (**5**)を、四酸化オスミウムを用いて立体選択的ジヒドロキシ化を行い、ラセミ体の *cis*-khellactone (**6**)を収率 98%で調製した。これにクロトン酸と DCC、DMAP を用いたエステル化、続いて無水酢酸とピリジンを用いたアセチル化を行うことで、isosamidin (**1**)とその位置異性体を 2:1 の比率で合成することに成功した。現在は、位置選択的エステル化、不斉ジヒドロキシル化、誘導体の合成ならびにそれらの生理活性評価について取り組んでいる。



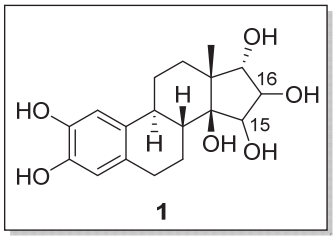

Synthetic studies, isosamidin, *Peucedanum japonicum*

講演番号：4C12a03
講演日時：3 月 20 日 09:50～ C 校舎 12 会場

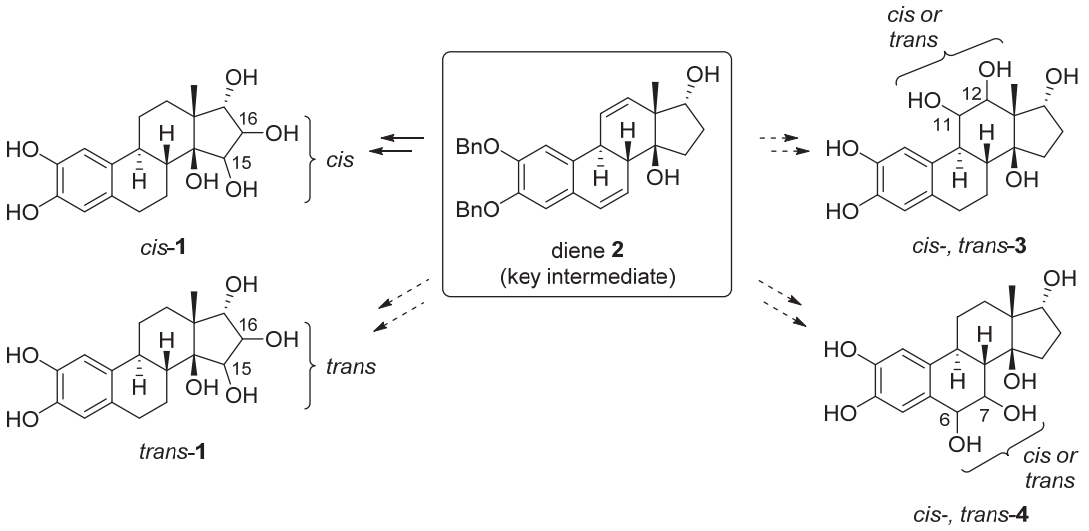
# Inagami-Tamura EDLF (Endogenous Digitalis-Like Factor) の合成化学的研究: 多様な候補物質の合成

# Synthetic studies on Inagami-Tamura EDLF (Endogenous Digitalis-Like Factor): synthesis of various candidates

○橋本 圭古、池田 藍、西川 俊夫、中崎 敦夫 (名大院生命農)
○Keiko HASHIMOTO, Ai IKEDA, Toshio NISHIKAWA, Atsuo NAKAZAKI (Nagoya Univ.)




Inagami-Tamura EDLF (Endogenous Digitalis-Like Factor) は Vanderbilt 大学の稲上・田村らによってウシの副腎より単離された物質であるが [1]、得られた量の少なさのため詳細な化学構造は明らかになっていない。その後、推定構造（**1**）が提唱されたが [2]、15,16 位の水酸基の実際の位置や立体化学は不明のままである。そこで我々は、推定構造（**1**）をもとに様々な候補物質を合成し活性評価を行うことにより、Inagami-Tamura EDLF の真の構造を明らかにすることを目的として研究を開始した。昨年度の本年会において我々は、様々な候補物質へと変換可能な鍵中間体であるジエン **2** を得ることに成功し、*cis*-**1** の合成を達成したことを報告した [3]。そこで今回は、その他の候補物質（*trans*-**1**、*cis-, trans*-**3** 及び *cis-, trans*-**4**）の合成を目指した。すなわち、ジエン **2** を起点とし、ジヒドロキシル化による *cis* 体の合成を、エポキシ化とその開環及び Prevost 反応による *trans* 体の合成を検討したので報告する。




References
1. Inagami, T. *et al*. *Biochem. Biophy. Res. Commun.* **1987**, *149*, 468.
2. Sakakibara, M. *et al*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1996**, *60*, 405.
3. 橋本圭古、池田藍、西川俊夫、中崎敦夫, 日本農芸化学会 2016 年度大会 3B079.

endogenous digitalis-like factor, steroid, divergent synthesis

講演番号：4C12a04
講演日時：3 月 20 日 10:05～ C 校舎 12 会場

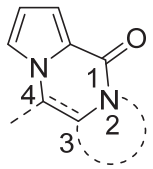
# ピロロピラジノン骨格の新規合成法とペラミンの全合成

# New constructive methods of pyrrolopyrazinone and total synthesis of peramine

○山本 雄太、西川 俊夫、中崎 敦夫 (名大農)
○Yuta YAMAMOTO, Toshio NISHIKAWA, Atsuo NAKAZAKI (Nagoya Univ.)

【目的】

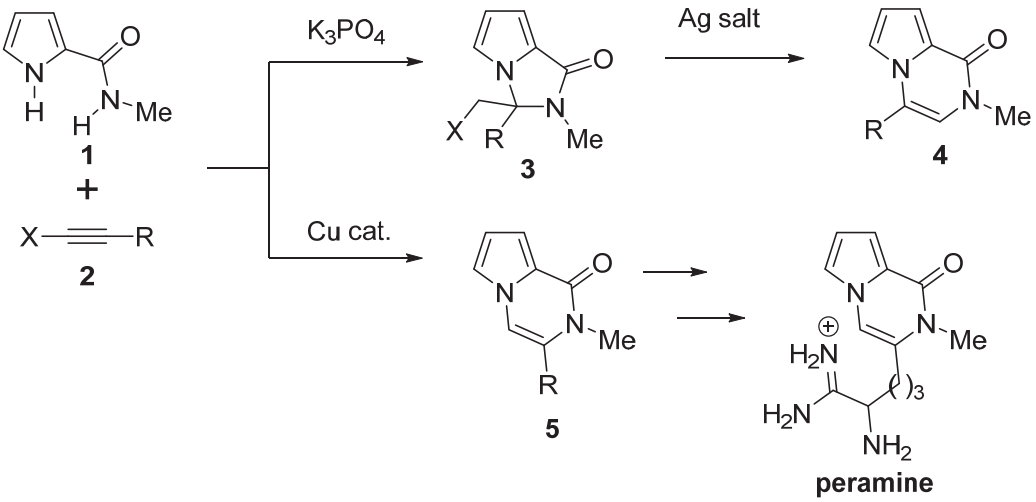
ピロロピラジノンやジヒドロピロロピラジノン骨格を含む天然物には、複雑な構造と顕著な生理活性を示すものが多い。これらの多くは天然から微量しか得られないため、化学合成による供給が望まれている。そこで、我々はピロロピラジノン骨格の効率的な構築法の開発とそれを利用した天然物合成に取り組んでいる。今回、ピロールアミドとハロアセチレンを用いて、3 位と 4 位の置換パターンの異なるピロロピラジノンの構築法の開発に成功したので報告する。



dihydropyrropyrazinone
pyrrolopyrazinone

【方法・結果】

リン酸カリウム存在下ピロールアミド **1** とハロアセチレン **2** を加熱し得られたアミナール **3** に、銀塩による環拡大が起こることで、ピロロピラジノン **4** が得られる。銅触媒存在下 **1** と **2** を反応させると、ピロロピラジノン **5** が得られる。後者の反応を用いて天然物である peramine[1)]の短段階合成を達成した。




1) D. D. Rowan *et al*. *J. Chem. Soc., Chem. Commun*., **1986**, 935-936.

pyrrolopyrazinone, peramine, chemical synthesis

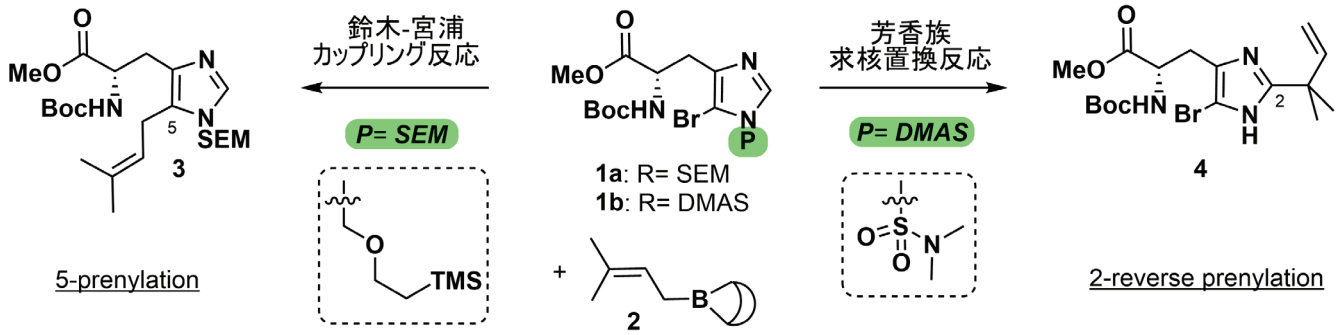
講演番号：4C12a05
講演日時：3 月 20 日 10:20～ C 校舎 12 会場

# 電子密度制御によるイミダゾール環の位置選択的なプレニル化および逆プレニル化反応
# Regioselective prenylation and reverse-prenylation of imidazole controlled by its electron density

○中根 嘉祈、中崎 敦夫、西川 俊夫 (名大院生命農)
○Yoshiki NAKANE, Atsuo NAKAZAKI, Toshio NISHIKAWA (Nagoya Univ.)

芳香環への炭素-炭素結合形成反応は、クロスカップリングや芳香族求核置換反応を含む数多くの報告があり、全合成研究や医薬品合成など様々な場面で利用されている。しかし、その中でもイミダゾール環上で利用できる反応は圧倒的に少ない。これは、環内に存在する 2 つの窒素原子がつくり出すイミダゾール固有の反応性に起因すると考えられる。その一方で、含イミダゾール天然物は数多く報告されており、その修飾反応の多様化が望まれている。

今回我々は、ヒスチジンを用いた新規なイミダゾールのプレニル化および逆プレニル化反応を開発したので報告する。イミダゾール窒素上の保護基が異なる二つのヒスチジン誘導体 **1a** および **1b** に対し、プレニル-9-BBN **2** との反応を試みた。その結果、この保護基を適切に選択することによって、プレニル基および逆プレニル基の導入位置を高度に制御することに成功した。すなわち、イミダゾールの保護基を電子供与性の SEM 基とした **1a** の場合には、臭素を足掛かりとした鈴木-宮浦カップリング反応が進行し 5 位プレニル体 **3** を与えた。一方、保護基を電子吸引性の DMAS 基とした **1b** の場合には、芳香族求核置換反応により 2 位逆プレニル体 **4** を与えた。高い電子密度を持つイミダゾール環上での芳香族求核置換反応は困難であり、これまでに数例しか報告がない [1-3]。本発表では、プレニル基および逆プレニル基導入の位置選択性の発現や推定反応機構を含む詳細を述べる。




## References

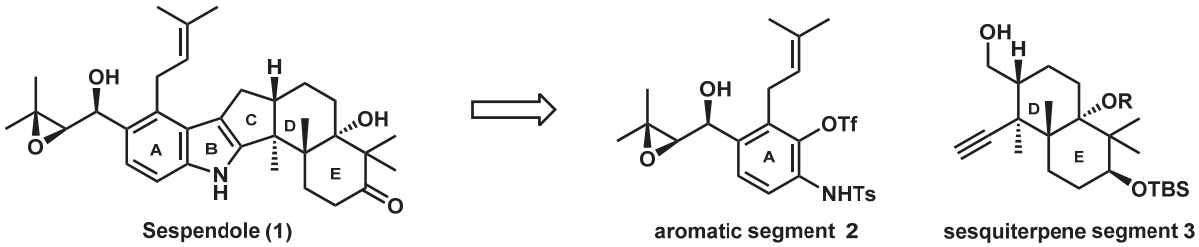
1. Itoh, T.; Hasegawa, H.; Nagata, K.; Okada, M.; Ohsawa, A. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 5399.
2. Itoh, T.; Hasegawa, H.; Nagata, K.; Ohsawa, A. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 1319.
3. Itoh, T.; Miyazaki, M.; Nagata, K.; Ohsawa, A. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 4383.

imidazole, histidine, prenylation/reverse-prenylation

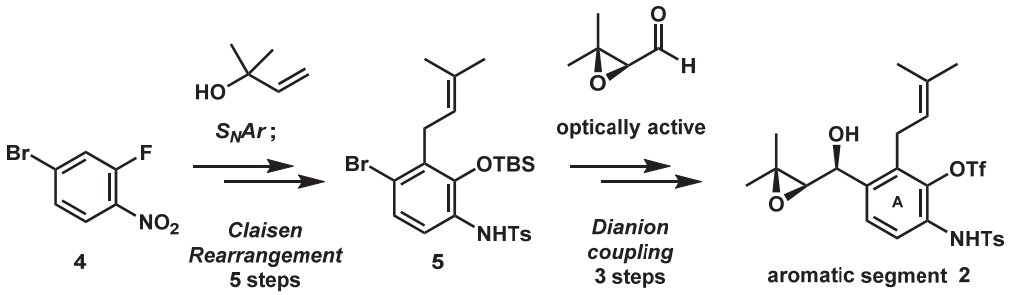
講演番号：4C12a06
講演日時：3 月 20 日 10:35～ C 校舎 12 会場

セスペンドールの合成研究　芳香環セグメントの不斉合成
Synthetic studies on sespendole -asymmetric synthesis of aromatic segment-
○小野 義貴、植木 佳織、西川 俊夫 (名大農)
○Yoshiki ONO, Kaori UEKI, Toshio NISHIKAWA (Nagoya Univ.)

【目的】Sespendole (**1**) は，2004 年に Tomoda らによって糸状菌 pseudobotrytis terrestris FKA-25 から単離されたインドールアルカロイドで，マクロファージの泡沫細胞化の抑制をすることが知られており，動脈硬化病のリード化合物として期待されている [1]。このような重要な生物活性を持つこと，さらに 5 つの環を持つ複雑な構造であることに興味を持ち，全合成に着手した。合成計画は，A 環を含む aromatic segment **2** と DE 環を含む sesquiterpene segment **3** をそれぞれ合成し，合成の最終盤で BC 環を一挙に構築するというものである。我々は既に両セグメントのラセミ体合成を達成している [2)3)]。このラセミ体合成の経路を用いて **2** の光学活性体の合成に取り組んだが，失敗に終わった。そこで本発表では全く新しい合成経路を計画し，**2** の合成を達成したので報告する。




【結果】4-bromo-2-fluoronitrobenzene (**4**)を出発原料として芳香族求核置換反応，Claisen 転位を含む 5 段階で **5** を合成した。この **5** に対して鍵反応であるジアニンオンカップリングを含む 3 段階で **2** の合成を達成した。




Reference
1) Tomoda, H. *et al*. *J. Antibiot*. **2006**, *59*, 338　2)Adachi, M. *et al*. *Org.Lett.* **2012**, *14*, 114
3) Sugino, K. *et al. Synlett*. **2011**, *5*, 647

sespendole, indole alkaloid, natural product

講演番号：4C12a07
講演日時：3 月 20 日 11:00～ C 校舎 12 会場

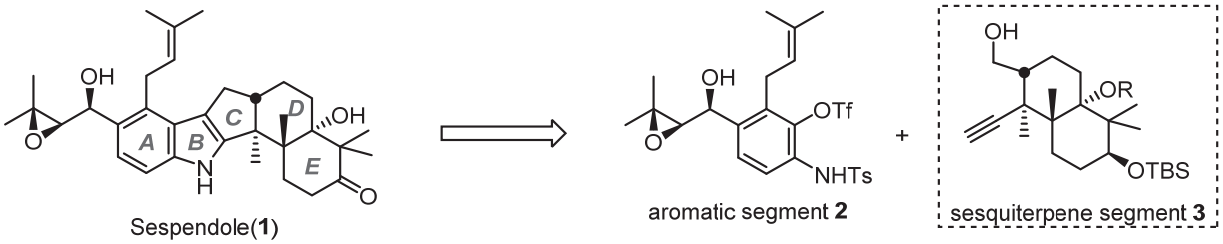
# セスペンドールの合成研究　セスキテルペンセグメントの不斉合成

# Synthetic studies on sespendole -asymmetric synthesis of sesquiterpene segment-

○植木 佳織、スシヲング ジットラ、西川 俊夫 (名大農)
○Kaori UEKI, Jittra SUTHIWONG, Toshio NISHIKAWA (Nagoya Univ.)

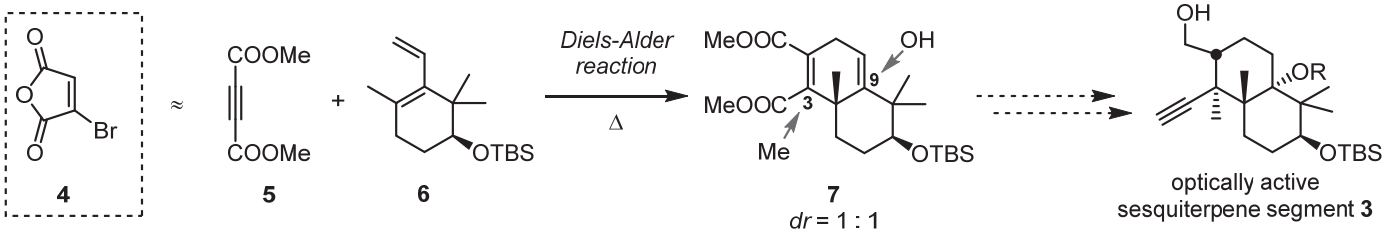
【背景と目的】

セスペンドール**(1)**は糸状菌 *Pseudobotrytis terrestris* FKA-25 より単離されたインドールアルカロイドである [1)]。我々はこの化合物を芳香環セグメント **2** とセスキテルペンセグメント **3** に分けて合成を進めており、これまでにそれらのセグメントのラセミ体合成を完了した [2,3)]。本研究ではラセミ体合成とは異なるルートでの **3** の光学活性体の合成を目的とする。




【方法と結果】

Mori らは光学活性なジエン **6** と親ジエン **5** との Diels-Alder 反応で **7** が得られることを報告している [4)]。そこで **7** へ水酸基とメチル基を導入してセスキテルペンセグメントを合成する計画を立てた。しかし、この Diels-Alder 反応は面選択性を示さないと報告されている。そこで、親ジエンをブロモマレイン酸無水物 **4** に変えることによってその選択性を向上させ **7** へと誘導し、また、立体障害の大きい 3 位へのメチル基の導入に成功した。現在は 9 位への水酸基の導入を検討中である。




References

1) Tomoda, H. and Ōmura, S. *et al. Mycoscience* **2004**, *45*, 9. 2) Adachi, M.; Higuchi, K.; Thasana, N.; Yamada, H.; Nishikawa, T. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 114. 3) Sugino, K.; Nakazaki, A.; Isobe, M.; Nishikawa, T. *Synlett* **2011**, 647. 4) K. Mori, K.; Watanabe, H. *Tetrahedron* **1986**, *42*, 273.

sespendole, indole alkaloid, Diels-Alder reaction

講演番号：4C12a08
講演日時：3 月 20 日 11:15～ C 校舎 12 会場

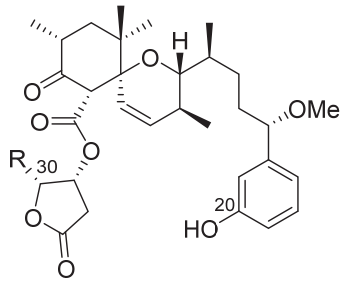
# オシラトキシン D の合成研究

# Synthetic studies on Oscillatoxin D

○新木 悠介、野倉 吉彦、西川 俊夫 (名大院生命農)
○YUSUKE ARAKI, YOSHIHIKO NOKURA, TOSHIO NISHIKAWA (Nagoya Univ.)

【背景と目的】

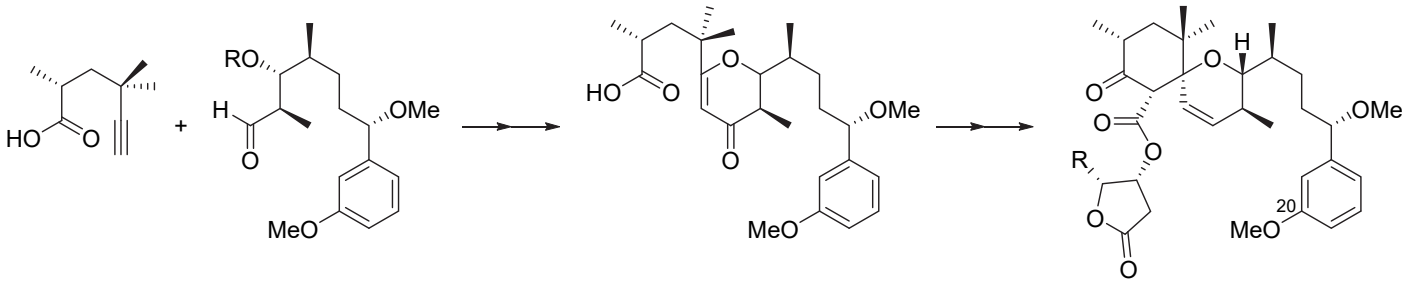
Oscillatoxin D と 30-methyloscillatoxin D はシアノバクテリアの一種である Oscillatoriaceae より、aplysiatoxin とともに単離されたポリケチド天然物で、L1210 細胞に対する細胞毒性があると報告されているがその詳細は不明である [1]。スピロエーテル骨格という非常にユニークな構造を有することから合成のターゲットとして注目を集めているが、全合成は市原らの一例のみである [2]。そこで本研究では、oscillatoxin D とその類縁体の全合成を目指した。




oscillatoxin D : R = H
30-methyloscillatoxin D : R = $CH_3$

【方法と結果】

昨年の本大会で、左右セグメント **1**、**2** の合成とこれらのカップリング等によりジヒドロピラノン **3** を合成したことを報告した [3]。今回、**3** に対し正宗法により β−ケトエステルを導入、続くスピロ環化、エステル交換によりラクトンを導入し oscillatoxin D の 20-OMe 体 **4** の合成を達成した。




left segment **1** right segment **2** dihydropyranone **3** **4**

References

1) Moore, R. E. et al. *J. Org. Chem*. **1985**, *50*, 1255-1259.

2) Ichihara, A. et al. *Tetrahedron Lett*., **1995**, *36*, 3373-3374.

3) 野倉吉彦、西川俊夫　日本農芸化学会 2016 年度大会講演要旨集 p.1698.

oscillatoxin, natural product synthesis, spiroether

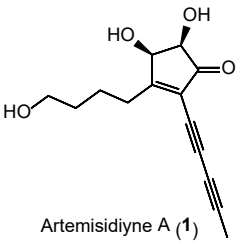
講演番号：4C12a09
講演日時：3 月 20 日 11:30～ C 校舎 12 会場

# Artemisidiyne A の合成研究

# Synthetic studies on artemisidiyne A

○前田 康希、久世 雅樹、滝川 浩郷（神戸大院・農）
○Koki MAEDA, Masaki KUSE, Hirosato TAKIKAWA (Kobe Univ.)

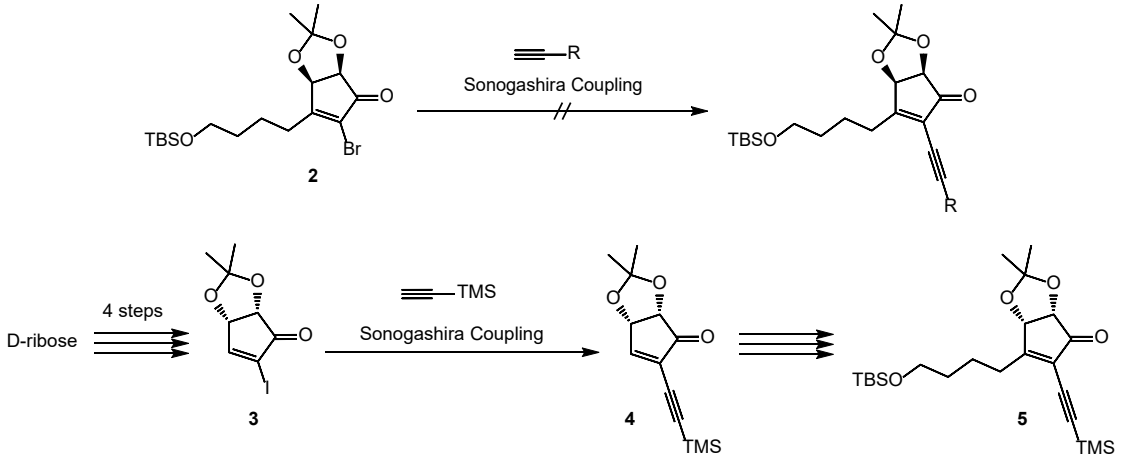
【目的】Artemisidiyne A は *Artemisia lactiflora* Wall.より単離・構造決定され、特定のヒト癌細胞系に対して細胞毒性を示すことが報告された抗腫瘍活性物質である [1]。この化合物は天然物としては特異な構造を有している。この点から合成化学的に標的天然物として興味深いと捉え、本研究は **1** の化学合成を目的としている。



Artemisidiyne A (**1**)

【方法】β位に側鎖を持つα-ブロモシクロペンテノン **2** を基質とした薗頭カップリングでは望みのカップリング体が得られなかった。そこでまずβ位に側鎖を持たないα-ハロシクロペンテノンを基質としてアルキニル側鎖とのカップリングを行い、その後にβ位へのアルキル側鎖導入を試みた。

【結果】報告に従い [2]、D-リボースからα-ヨードシクロペンテノン **3** を合成した。**3** を薗頭カップリングに供したところ、速やかに望みのカップリング体 **4** が得られた。その後に **4** のβ位へアルキル側鎖を導入し、**5** を合成した。これにより、**1** の基本骨格構築が達成された。




1) Mei-tian Xiao *et al.*, *Phytochem. Lett.* **2014**, *8*, 52-54
2) (a) Phil S. Baran *et al.*, *J. Org. Chem.*, **2015**, *80*, 7019-7032
(b) Lak Shin Jeong *et al.*, *J. Med. Chem.*, **2011**, *54*, 930-938

*Artemisia lactiflora*, antitumor activity, sonogashira coupling reaction

発表責任者：前田 康希（maedakoki722@gmail.com）

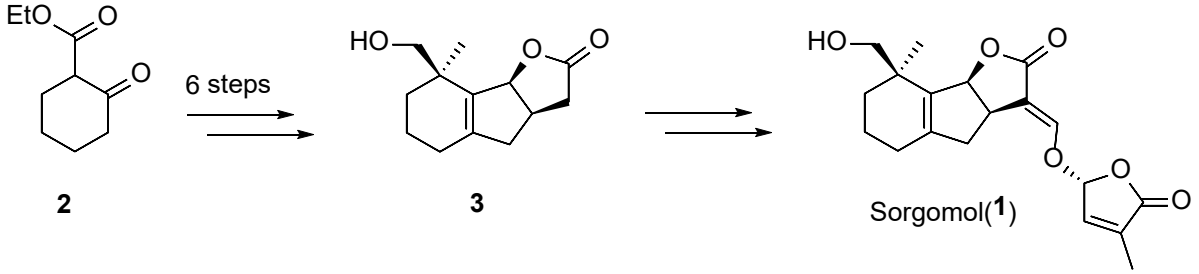
講演番号：4C12a10
講演日時：3 月 20 日 11:45～ C 校舎 12 会場

# Sorgomol 光学活性体の合成
# Synthesis of optically active sorgomol

○山田 莉子、秦 大介、久世 雅樹、滝川 浩郷 (神戸大院・農)
○RIKO YAMADA, DAISUKE HATA, MASAKI KUSE, HIROSATO TAKIKAWA (Kobe Univ.)

【目的】
宿主となる作物に寄生し、それらを枯死させる根寄生雑草が世界の農業に甚大な被害を与えている。ストリゴラクトンと呼ばれる化合物群は、これら根寄生雑草の種子発芽誘導物質である。2008 年、米山らによって、ソルガムの根滲出物よりストリゴラクトンの一種である sorgomol (**1**)の単離およびその構造決定が報告された[1)]。当研究室ではすでに **1** のラセミ・ジアステレオマー混合物の合成を達成しているが[2)]、光学活性体の合成には至っていない。そこで本研究では、**1** の光学活性体合成を目的とする。

【方法および結果】
市販の ethyl 2-oxocyclohexanecarboxylate (**2**)を出発物質とし、ラセミ体合成の鍵中間体である三環性ラクトン **3** を 6 段階で合成した。この三環性ラクトン **3** の光学分割を検討し、酵素を用いた速度論的分割によって光学活性体を得た。次に、**3** の TES 保護体を調製し、これに対してホルミル化、D 環導入を行ったが、望みの反応は進行しなかった。そこで **3** の TBS 保護体を合成し、同様の反応および TBS 基の脱保護を行い、僅かながら、sorgomol (**1**)の光学活性体を得ることに成功した。現在、各段階の最適化を行っている。




1) Xie, X. *et al.*,. *Tetrahedron Lett.*, **2008**, *49*, 2066-2068.
2) Kitahara, S. *Et al.*, *Tetrahedron Lett.*, **2011**, *52*, 724-726.

strigolactone, germination stimulant, kinetic resolution

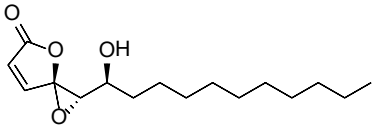
講演番号：4C12a11
講演日時：3 月 20 日 12:00～ C 校舎 12 会場

# Ramariolide 類の化学合成

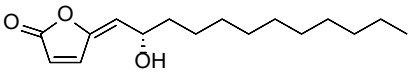
# Synthesis of Ramariolides

○森口 舞子、久世 雅樹、滝川 浩郷（神戸大院農）
○Maiko MORIGUCHI, Masaki KUSE, Hirosato TAKIKAWA (Kobe Univ.)

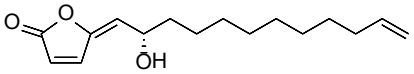
【目的】Ramariolide 類はホウキタケ属キノコ（*Ramaria cystidiophora*）から単離された天然物であり、結核菌などのマイコバクテリアに対する抗菌活性を示し、新規抗マイコバクテリア剤のリード化合物として注目されている [1)]。我々は ramariolide A,C の合成に成功しており、本研究では ramariolide D の化学合成を目的とした。




Ramariolide A

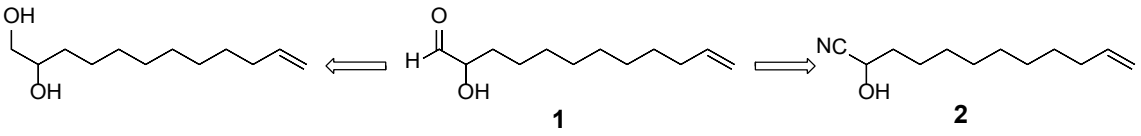



Ramariolide C




Ramariolide D

【方法】Ramariolide A は C のエポキシ化により合成でき、ramariolide C はシロキシフランとα-ヒドロキシアルデヒドとの向山アルドール型反応と引き続く脱水反応で合成できる。そこで、同様の経路を用いて、ramariolide D の側鎖部分の前駆体となるα-ヒドロキシアルデヒド（**1**）の合成を目指した。しかしながら、1,2-ジオールから **1** の合成は困難であった。そのため、シアノヒドリン（**2**）を経由して **1** を合成することで ramariolide D の合成を目指すことにした。




**1** **2**

【結果】市販の 10-undecen-1-ol を出発原料とし、シアノヒドリン（**2**）へ誘導することで増炭し、シアノ基を還元することでα-ヒドロキシアルデヒド（**1**）の TBS 保護体を得ることができた。続いて、向山アルドール型反応によってフラン環を導入した後、脱水反応およびヒドロキシ基の脱保護により ramariolide D を総工程数 8 段階（総収率 4.2%）で得た。また、同様にシアノヒドリンを経由した合成経路で ramariolide A, C を効率よく合成できるルートへと改善することもできた。

文献 1 ：Centko R, et al., *J. Nat. Prod.*, **75**, 2178-2182 (2012).

total synthesis, α-hydroxyaldehyde, butenolide

発表責任者：久世雅樹（kuse@eagle.kobe-u.ac.jp）

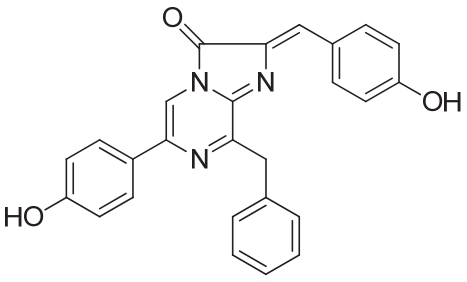
講演番号：4C12a12
講演日時：3 月 20 日 12:15～ C 校舎 12 会場

# 高輝度発光基質による発光タンパク質フォラシンの再構成と発光活性
# Reconstituted Pholasin with Non-natural Substance and its Bioluminescent Activity

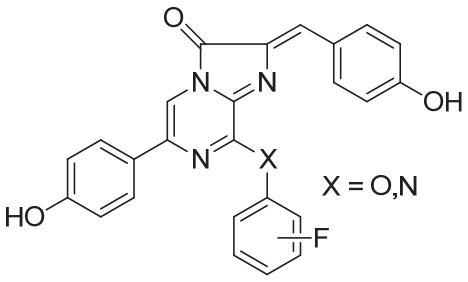
○大西 里佳、久世 雅樹、滝川 浩郷（神戸大院農）
○Rika OHNISHI, Masaki KUSE, Hirosato TAKIKAWA (Kobe Univ.)

【目的】発光タンパク質は生細胞内における生体成分の濃度変化をリアルタイムで可視化することができる。ヒカリカモメガイの発光タンパク質（フォラシン）はデヒドロセレンテラジン（DCL）を基質として活性酸素により発光する。この発光系を活性酸素の計測に利用するためには、より明るく光る基質が必須である。そこで天然型より高輝度発光する DCL 誘導体（**A**）の効率的な合成法を確立することを目的とした。

【方法】フォラシンの発光基質である DCL の分子構造を修飾して発光強度を上げることにした。DCL の 2 個のフェノールは発光に必須であり修飾することはできない。一方、DCL の 8 位にフェニルチオ基を導入すると発光するものの、天然型より発光強度が低下することがわかっている。これは硫黄原子が活性酸素と反応し発光を阻害してしまうためだと考えられた。そこで硫黄原子の代わりに酸素原子や窒素原子を導入する新規合成方法を確立することにした。またこれら誘導体の発光活性を測定することで、導入する原子や置換基による発光強度の差を調べることにした。



デヒドロセレンテラジン (DCL)



DCL 誘導体 (**A**)

【結果】市販のアミノピラジンを出発原料としてヨウ素化、根岸カップリング反応、8 位ブロモ化に続くカップリング反応により、フェノール、またはアニリンを導入し、セレンテラミン誘導体を化学合成した。これをフェニルピルビン酸と縮合してデヒドロアミノ酸へと誘導し、最後に無水酢酸で処理して、6 つの DCL アナログの化学合成を達成した。そのうち、発光測定によって 5 つのアナログが天然型より高輝度を示すことが明らかになった。

pholasin, bioluminescence, photoprotein

発表責任者：久世雅樹（kuse@eagle.kobe-u.ac.jp）

講演番号：4C13a01
講演日時：3 月 20 日 09:20～ C 校舎 13 会場

# イサダ（ツノナシオキアミ）脂質の解析

# Analysis of pacific krill oil.

○山田 秀俊[1]、箱崎 真友佳[1]、山崎 裕也[2]、小池 誠治[2]、長洞 希[1]、矢野 明[1]（[1]岩手生工研、[2]（株）ADEKA）
○Hidetoshi YAMADA[1], Mayuka Hakozaki[1], Yuya Yamazaki[2], Seiji Koike[2], Nozomi Nagahora[1], Akira Yano[1] ([1]IBRC, [2]ADEKA)

**【目的】**三陸（岩手県・宮城県）地域では、毎年３月から４月にかけて約 3 万トンのイサダ（ツノナシオキアミ、学名 : *Euphausia pacifica*）が水揚げされる。我々はイサダの食品利用促進を目的として、機能性研究を行い、脂質代謝促進因子として 8-ヒドロキシエイコサペンタエン酸（8-HEPE）を同定した。8-HEPE はエイコサペンタエン酸（EPA）の 8 位炭素に水酸基が導入された脂肪酸の一種であり、EPA よりも高い脂肪燃焼促進作用を有している。8-HEPE は EPA 含有量の高い硬骨魚類（サンマ、サバ、イワシなど）には含まれず、イサダおよび南極オキアミに含有される成分である。8-HEPE に加えて、イサダには遊離型の EPA、DHA 含有量が高いという特徴があり、硬骨魚類のオイルとは脂質組成、脂肪酸組成が異なると考えられた。そこで、本研究では、イサダに含有される脂質の特徴について明らかにすることを目的として解析を行った。
**【方法】**2016 年 3 月に岩手県で水揚げされたイサダより、Bligh-Dyer 法によって脂質を抽出し、TLC-FID を用いて脂質組成、ガスクロマトグラフ質量分析装置（GC/MS）を用いて脂肪酸組成を分析した。遊離脂肪酸および水酸化脂肪酸は高速液体クロマトグラフ質量分析装置（LC-QTOFMS）にて分析した。
**【結果】**イサダの脂質含有量は 2.39±0.04%であり、脂質組成は、triacylglycerols（TG）23.0±1.9%、phosphatidylcholine（PC）32.6±2.6%、phosphatidylethanolamine（PE）14.9±2.1%、free fatty acid（FA）7.0±1.7%であった。脂肪酸組成は、飽和脂肪酸 31.23±2.20%、一価不飽和脂肪酸 21.22±1.77%、多価不飽和脂肪酸 28.74±7.21%であった。遊離脂肪酸は炭素数 12, 14, 16, 18, 20, 22 の脂肪酸で構成されており、その中でも炭素数 16 の高度不飽和脂肪酸、6,9-Hexadecadienoate acid（C16:2）、6,9,12-Hexadecatrienoic acid（C16:3）、6,9,12,15-Hexadecatetraenoic acid（C16:4）が含有されているという特徴が見られた。また、8-HEPE の他にも、8-hydroxy-eicosatetraenoic acid（8-HETE）、10-hydroxy-docosahexaenoic acid（10-HDoHE）という水酸化脂肪酸が含有されていた。
【考察】イサダオイルは、リン脂質型の EPA・DHA、C16 高度不飽和脂肪酸、8-HEPE、8-HETE、10-HDoHE という特徴的な脂質を含有しており、新たな機能性脂質供給源として興味深い素材である。また、イサダ（オキアミ）は独自の脂質代謝経路を有している可能性があることから、今後は脂質代謝酵素の解明に取り組んでいきたい。

krill, EPA DHA, hydroxy fatty acid

発表責任者：山田秀俊（hyamada@ibrc.or.jp）

講演番号：4C13a02
講演日時：3 月 20 日 09:35～ C 校舎 13 会場

# イラガ幼虫分泌液由来の TRPV1 活性物質の探索

# Search for TRPV1 activated substance from slug caterpillar (*Monema flavescens*) venom

○水谷 真里絵、平川 祥成、今井 邦雄、勝崎 裕隆（三重大）
○Marie MIZUTANI, Yoshinari HIRAKAWA, Kunio IMAI, Hirotaka KATSUZAKI (Mie Univ.)

[目的]

イラガ (*Monema flavescens*) はチョウ目イラガ科の昆虫であり、幼虫の体表には多数の棘が存在する。この棘を刺激すると棘の先端部から液体を分泌する。棘が皮膚に触れると非常に激しい痛みやかゆみを伴う発疹が生じる。この原因は棘の先端部から出される分泌液によるものであると考えられているが、分泌液中のどの成分が痛みを引き起こすかは解明されていない。そこで痛みと密な関連があると示唆されている transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) に着目した。TRPV1 は非選択性の陽イオンチャネルの 1 つであり、カプサイシンの刺激によって活性化され $Ca^{2+}$を細胞内に流入させる。本研究では TRPV1 発現 HEK293 細胞を用いて、細胞内カルシウムイメージングを行うことでイラガ幼虫分泌液に含まれる TRPV1 活性化物質を探索することを目的とした。

[方法・結果]

ポリ-D-リシンコートを施した 96 穴マルチウェルプレートに TRPV1 発現 HEK293 細胞 $8.0\times10^4$ cells/mL を 100 μL ずつ分注し、$CO_2$ インキュベーター内で一晩培養した。培養後、培地を除去し、蛍光試薬である Fluo8-AM を 100 μL ずつ添加し細胞内に導入した。そこに、対照として超純水、陽性対照として 0.1 mg/mL 乳化カプサイシン溶液、試料溶液としてイラガ試料溶液 10 倍希釈、100 倍希釈、1000 倍希釈を添加し、蛍光変化を観察した。その結果、0.1 mg/mL 乳化カプサイシン溶液、10 倍希釈、100 倍希釈に蛍光の上昇が観察された。しかしこれらが TRPV1 を活性化したことにより $Ca^{2+}$流入が起こり蛍光強度の上昇が起こったかどうかは不明である。そこで、TRPV1 を発現していない HEK293 細胞に対しても先ほどと同様にカルシウムイメージングを行った。その結果イラガ試料溶液 10 倍、100 倍希釈に対する蛍光上昇は確認されなかった。以上より、イラガ幼虫分泌液には TRPV1 を活性化させる物質が含まれていると判断した。

次にイラガ試料溶液 7 本分を RP-HPLC によりピークごとに分取し、計 107 画分を得た。保持時間 130 分から 160 分のピーク画分を超純水 100 μL に溶解し、そこからさらに 5 倍希釈してカルシウムイメージングを行った。その結果画分 85 と 87 に蛍光上昇が確認された。

マトリックスにα-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid (CHCA) と 1,5-diaminonaphthalene (1,5-DAN) を使用し、イラガ試料溶液分取画分と 0.4 μL ずつ混合し、MALDI-TOF/MS により質量分析を行った。画分 85 では分子量の増加を確認し、87 では混合物の一部に分子量の増加を確認した。以上より、これらの画分にはシステイン残基をもつペプチドが含まれていると推定した。

slug caterpillar, venom, TRPV1

講演番号：4C13a03
講演日時：3 月 20 日 09:50～ C 校舎 13 会場

# クルミホソガの種内での寄主転換に関与する産卵刺激物質の特定

# Identification of oviposition stimulants of the leaf-mining moth *Acrocercops transecta*

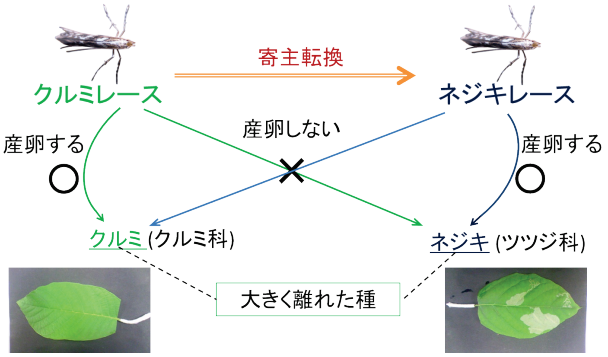
○下田 将大[1]、勝手 智子[1]、小林 拓矢[1]、吉永 直子[1]、森 直樹[1]、大島 一正[2]、小野 肇[1]([1]京大農、[2]京都府立大・生命環境)
○Shota SHIMODA[1], Tomoko KATSUTE[1], Takuya KOBAYASHI[1], Naoko YOSHINAGA[1], Naoki MORI[1], Issei OSHIMA[2], Hajime ONO[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Pref. Univ.)

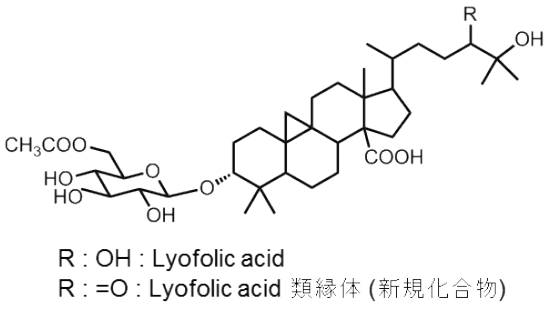
［背景・目的］

クルミホソガ（*Acrocercops transecta*）にはクルミあるいはネジキを寄主とする 2 つの種内集団が存在し，それぞれクルミレース・ネジキレースと呼ばれる（図）．クルミとネジキは系統的に離れた種であるが，ネジキレースは寄主転換によりクルミレースから派生したと考えられている．その際，植物に含まれる化学物質が重要な役割を果たしたと考えられる．そのため，寄主認識の鍵となる産卵刺激物質を特定した．

［方法・結果］

透明なプラスチックの箱に，サンプルを塗布したカバーガラス，対照としてエタノールを塗布したカバーガラスを置いた．交尾したネジキレースの雌を入れ，一晩放置し，カバーガラス周辺の卵の数を数えて，産卵刺激活性を評価した．その結果，ネジキ葉の酢酸エチル抽出物が活性を示した．これをカラムクロマトグラフィーで分画して，生物検定を行った結果，テルペノイドを含む画分が弱い活性を示した．他の昆虫では糖が産卵刺激物質と知られているため，ネジキ葉の糖画分とテルペノイド画分の混合物を供試した．その結果，高い活性が認められた．テルペノイド画分から主成分として lyofolic acid とその類縁体を単離，同定した（図）．これらの化合物は，糖画分を混合すると顕著な活性を示したため，産卵刺激物質と判断した．さらに，クルミの葉片に lyofolic acid 類縁体を塗布し，同様の産卵試験を行った結果，非常に高い活性が認められた．そのため，ネジキレースがクルミの葉に産卵しない理由として，クルミの葉にはネジキレースの産卵刺激物質が含まれていないことが考えられる．同時に，クルミの葉にはネジキレースに対する産卵阻害物質が含まれていないことが示唆された．




Leaf-mining moth *Acrocercops transecta*, Oviposition stimulant, Host shift

発表責任者：小野　肇（onoono@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4C13a04
講演日時：3 月 20 日 10:05～ C 校舎 13 会場

# マドボタル亜科のホタルが持つステロイド毒 bufadienolide の化学分析
# Chemical analysis of bufadienolides in Japanese Lampyrinae fireflies

○氏家 里奈子[1]、吉田 達哉[1]、竹内 寛彦[2]、江頭 幸士郎[3]、城野 哲平[4]、吉永 直子[1]、小野 肇[1]、森 哲[5]、森 直樹[1] ([1]京大院農、[2]京大フィールド研、[3]京大院人環、[4]琉球大熱生研、[5]京大院理)
○Rinako UJIIE[1], Tatsuya YOSHIDA[1], Hirohiko TAKEUCHI[2], Koshiro ETO[3], Teppei JONO[4], Naoko YOSHINAGA[1], Hajime ONO[1], Akira MORI[5], Naoki MORI[1] ([1]Kyoto Univ. Grad. Sch. Agri., [2]Kyoto Univ. FSERC, [3]Kyoto Univ. Grad. Sch. HES, [4]TBRC Univ. of the Ryukyus, [5]Kyoto Univ. Grad. Sch. Sci.)

[背景と目的]
日本に生息するヤマカガシ *Rhabdophis tigrinus* は, 餌のヒキガエルから強心性ステロイドである bufadienolide 類を摂取し, 防御用に蓄積している. 一方, 前大会で報告したように, 中国の同属のヘビ *R. pentasupralabialis* も同様に bufadienolide 類を蓄積しているが, そのうちの xylose 配糖体 bufadienolide は北米のマドボタル亜科のホタル *Lucidota atra* から報告された既知の化合物であった. このことから, このヘビはヒキガエルではなくホタルから bufadienolide を摂取するように食性進化したと示唆された. しかし, 北米やヨーロッパのマドボタル亜科のホタルが bufadienolide を持つ報告があるのみで, 中国を含むアジアのホタルについての bufadienolide の研究は進んでいない. 一方, 日本でも同亜科のホタルが肉食性昆虫や爬虫類などに捕食されないことは経験的に知られており, 毒を持つ可能性がある. 本研究では, マドボタル亜科の日本のホタルにおける bufadienolide 類の分布を調べた.

[方法と結果]
沖縄県石垣島で採集したマドボタル亜科のホタル, オオシママドボタル *Pyrocoelia atripennis* 幼虫 16 個体を液体窒素中で破砕し, MeOH で抽出した. この粗抽出液を LCMS で分析した結果, UV 吸収から bufadienolide と考えられる化合物が複数確認された. その中には MS フラグメントパターンから分子量 150 の糖 (xylose など) や, 分子量 180 の糖 (glucose, galactose など) の配糖体と考えられる化合物が存在した. 分子量 180 の糖が結合した配糖体 bufadienolide は動物では報告がないことから, それらのうち $[M+H]^+ = 593$ の化合物 (F593) を Sep-Pak C18 を用いて精製し, 各種 NMR による構造解析を行った. その結果, F593 は動物では新規の glucose 配糖体 bufadienolide であると示唆された.
また, 日本に生息するその他のマドボタル亜科のホタル, オオマドボタル *P. discillis* (京都, 大文字山), オキナワマドボタル *P. matsumurai* (沖縄本島), オバボタル *Lucidina biplagiata* (兵庫, 伊賀谷) についても粗抽出液を同様に LCMS で分析した. その結果, すべての種において UV 吸収から bufadienolide と考えられる化合物が複数確認された. LCMS での保持時間や MS フラグメントパターンから各種ホタルの持つ bufadienolide の種類はそれぞれ異なると考えられた.

firefly, snake, bufadienolide

講演番号：4C13a05
講演日時：3 月 20 日 10:20～ C 校舎 13 会場

ヤエヤマサソリの毒液に含まれる抗菌性ペプチドの探索と同定
Exploration and indentification of the antimicrobial peptides from the venom of the scorpion *Liocheles australasiae*

○岡部 諒太[1]、北中 淳史[1]、内山 博允[2]、須恵 雅之[2]、宮下 正弘[1]、中川 好秋[1]、宮川 恒[1]([1]京大院農、[2]東京農大)
○Ryota OKABE[1], Atushi KITANAKA[1], Hironobu UCHIYAMA[2], Masayuki SUE[2], Masahiro MIYASHITA[1], Yoshiaki NAKAGAWA[1], Hisashi MIYAGAWA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Tokyo University of Agriculture)

【目的】有毒生物の毒液には、神経に作用するペプチドだけではなく、抗菌性ペプチドも数多く含まれている。サソリの毒液にも抗菌性ペプチドが多く含まれていることが知られているが、その構造上の特徴として、13～56 残基程度の鎖長であること、疎水性が高いこと、またジスルフィド結合を持たないものが多いということなどが挙げられる。また、塩基性アミノ酸や疎水性アミノ酸を多く含む両親媒性ペプチドであることが多い。本研究では、これらの共通する構造的特徴をもとにしてヤエヤマサソリ（*Liocheles australasiae*）の毒液から抗菌性ペプチドを探索した。ペプチドの構造決定は、質量分析法によって得られるペプチドの部分的な構造情報に、次世代シーケンサーを用いた毒腺トランスクリプトーム解析で得られる網羅的な塩基配列情報を加味することで行った。同定したペプチドを化学合成し、その抗菌活性を評価した。
【方法】抗菌性ペプチドの探索を行うにあたって、疎水性が高く、ジスルフィド結合を持たないことを条件とした。まず、逆相 HPLC を用いて毒液を分取し、抗菌性を示した画分の成分に対して還元アルキル化反応を行い、反応前後での質量変化を LC/MS 分析によって調べた。質量変化を示さなかった成分は直鎖状ペプチドであると判断し、これらを MALDI-TOF MS/MS 分析に供した。得られた部分配列をもとに毒腺の全トランスクリプトーム解析によって得られたデータから一致する配列を検索することで全配列を決定した。ペプチドの合成は Fmoc 固相合成法によって行った。抗菌活性試験は、ペプチドを含んだ液体培地中での生育阻害を指標として *E. coli*、*S. aureus*、*B. subtilis* の 3 種類の細菌を用いて行った。
【結果】得られた HPLC 画分を MALDI-TOF MS 分析に供した結果、いくつかのペプチドが観測された。その中で質量 5079.8 Da、1605.9 Da および 2695.5 Da のペプチド（順に、LaCT1、LaCT2 および LaCT3 と名づけた）について全配列を決定した結果、それぞれ 47、14 および 24 残基のアミノ酸によって構成される直鎖状のペプチドであることが分かった。これらのペプチドは、既知の抗菌性ペプチドとの構造類似性を示したことから、LaCT2 および LaCT3 について、Fmoc 固相合成法を用いて化学合成して抗菌活性を評価したところ、いずれも活性を示し、これらが抗菌性ペプチドであることが確認できた。

antimicrobial peptide, organic synthesis, mass spectrometry

講演番号：4C13a06
講演日時：3 月 20 日 10:35～ C 校舎 13 会場

ササ葉抽出物の氷核形成阻害活性を利用した霜害防止の試み
The experiment of frost damage prevention utilizing the ice-nucleation inhibitory activity of *Sasa* leaf extracts
○鈴木 伸吾、福田 怜、福士 幸治、荒川 圭太（北大農）
○Shingo SUZUKI, Satoshi FUKUDA, Yukiharu FUKUSHI, Keita ARAKAWA (Hokkaido Univ.)

【目的】 一般に成長期の植物は低温や凍結に対する感受性が高く、凍霜害による傷害を受けやすい。霜害は、春先や晩秋の気温が氷点下温度付近まで下がった時に、植物の葉などに霜が降りて凍結することで発生する。霜が降りる原因のひとつとして、葉などの表面に付着した氷核細菌（*Pseudomonas* 属、*Erwinia* 属など）が-2～-3℃程度の比較的高い氷点下温度で氷核形成を促して水を凍結させることが考えられている。

これまでの研究によって、樹木の木部組織から氷核細菌の氷核活性を阻害する物質が見つかっている。これらは氷核形成阻害物質（または過冷却促進物質）と呼ばれ、フラボノール配糖体や加水分解性タンニンの一種が同定されている。フラボノール配糖体などは一般に抗酸化物質として知られており、様々な植物に含まれている。そのため、樹木の木部以外の組織や草本植物に含まれるポリフェノールなどにも同様に氷核活性を阻害することが十分に期待できる。

そこで我々は植物粗抽出液がどの程度効果的に霜害を防止できるかを検証するため、氷核細菌を添加した様々な植物粗抽出液を用いて氷核形成阻害活性を測定すると共に、植物葉上でも凍結を抑制できるか否かを試験した。

【方法および結果】 2015 年の 6～9 月に採取した植物葉などを粉砕し、試料生重量の約 10 倍量の溶媒（アセトン：水＝1：1）で抽出、乾固することで各種植物の粗抽出物を得た。

これまでに 65 種類の植物材料から得られた粗抽出物の水溶液（生鮮重 0.1 g 相当/mL）に氷核細菌（*E. ananas*）を加えて試料溶液を調製し、これを分注した液滴（2 μL）を 0.2℃/分で冷却して凍結温度を測定し、氷核形成阻害活性を評価した（ドロップレット凍結法）。その結果、クマイザサやセイヨウタンポポなどは比較的活性が高く、凍結温度を約 3℃下げた。また、比較的高い活性があった試料についてシャーレの中にヤマグワ葉切片などを並べ、そこに上記と同様の試料 10 μL を切片上にのせて、温度一定（-3, -4, -5, -6℃）の暗条件で 3 時間冷却した。その結果、ドロップレット凍結法で比較的高い活性が検出された試料は葉切片上でも凍結を抑制し、葉の凍結傷害が抑制された。

今回、氷核細菌を付着させたカイワレダイコンにクマイザサ抽出物を噴霧して氷点下温度（-3℃）で処理したところ、水を噴霧した場合（対照区）に比べて凍結が抑制された。現在、氷核形成阻害活性の高いクマイザサについて氷核形成阻害物質の単離、同定中である。また、これらの抽出物を用いた農作物の凍霜害防止技術への応用を目指している。

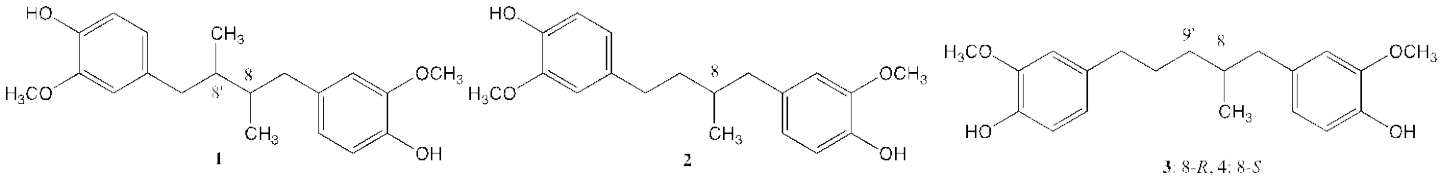
supercooling-facilitating substance, *Sasa senanensis*, frost damage

発表責任者：荒川圭太（keita-ar@for.agr.hokudai.ac.jp）

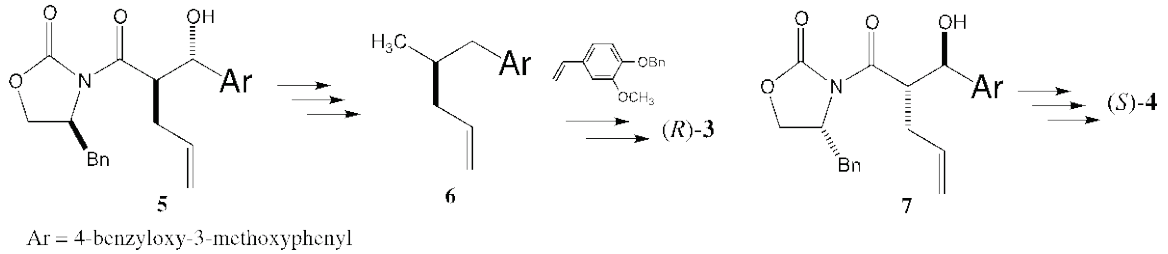
講演番号：4C13a07
講演日時：3 月 20 日 11:00～ C 校舎 13 会場

ブタン型リグナン、ノルリグナン、ネオリグナンの生物活性の比較
Comparison of the biological activity of butanelignan, norlignan, and neolignan
○西本 明日香[1]、西脇 寿[1]、西 甲介[1]、菅原 卓也[1]、秋山 浩一[2]、山内 聡[1] ([1]愛媛大農、[2]学術支援センター)
○Asuka NISHIMOTO[1], Hisashi NISHIWAKI[1], Kosuke NISHI[1], Takuya SUGAHARA[1], Koichi AKIYAMA[2], Satoshi YAMAUCHI[1] ([1]Ehime Univ., [2]ADRES)

【目的】これまで、非環状のブタン型リグナンである, 8,8'-lignan **1** および 9'-norlignan **2** の各立体異性体の合成を行い、細胞毒性活性、植物病原性かびに対する抗かび活性、抗ボウフラ活性を明らかにしてきた。今回は、ベンゼン環をつなぐ炭素鎖の長さとメチル基が、生物活性に与える影響を調べることを目的として、8,9'-neolignan の両鏡像異性体 **3**, **4** を合成し、生物活性試験を行った。




【方法・結果】Evans の *S*-体の不斉補助基及び *anti*-アルドール反応を用いて調整した **5** に対して、$BF_3.OEt_2$、$Et_3SiH$ によるベンジル水酸基の除去、$LiBH_4$ による不斉補助基の除去、生じた 1 級水酸基のトシル化、$LiAlH_4$ 還元を行ってアルケン **6** へ導いた。次に、Grubbs 触媒を用いたカップリング反応、水素添加を行い、*R*-体の 8,9'-neolignan **3** を得た。*anti*-アルドール生成物のエナンチオマー **7** から同様に *S* 体の 8,9'-neolignan **4** も得ることができた。キラルカラムを用いて、**3**, **4** の光学純度がそれぞれ 100%ee であることを確認した。(*S*)-**4** の *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype に対する抗かび活性は 8,8'-lignan **1** の 3 つの立体異性体とほぼ同じレベルであり、$EC_{50}$ 値が 56 μM であった。鏡像異性体 (*R*)-**3** の活性は $EC_{50}$ 値が 89 μM であり、(*S*)-**4** よりもやや弱かった。また、ガン細胞である HL-60, HeLa 細胞、昆虫細胞である Sf9 に対する **3**, **4** の $IC_{50}$ 値は 11-17 μM で、鏡像異性体間で差はなく、**1** のすべての立体異性体および *R*-9'-norlignan **2** とほぼ同レベルであった。しかし、*S*-9'-norlignan **2** との比較では、Sf9 に対しては同レベルであったが、HL-60, HeLa に対しては、1/3-1/5 の活性であった。以上の結果から、HL-60, HeLa へのより高い細胞毒性活性のため、リグナン構造からメチル基が 1 つ除かれた **2** の 9'-norlignan 構造、および、その *S* 体の立体構造の重要性が明らかになった。



Ar = 4-benzyloxy-3-methoxyphenyl

lignan, antifungal activity, cytotoxic activity

発表責任者：山内聡（yamauchi.satoshi.mm@ehime-u.ac.jp）

講演番号：4C13a08
講演日時：3 月 20 日 11:15～ C 校舎 13 会場

昆虫ステロイドホルモン生合成制御因子 Noppera-bo の X 線結晶構造解析：活性阻害剤との相互作用と創農薬への知見
X-ray crystallographic analysis of the insect steroid hormone biosynthesis regulator Noppera-bo: Interaction with its inhibitor and implication for development of new insecticides
稲葉 和恵[1]、小祝 孝太郎[2]、諸橋 香奈[1]、塩谷 天[1]、井上 英史[3]、藤川 雄太[3]、湯本 史明[2]、千田 俊哉[2]、○丹羽 隆介[1]（[1]筑波大生命環境、[2]高エネ研 IMSS、[3]東薬大生命）
Kazue INABA[1], Koutaro KOIWAI[2], Kana MOROHASHI[1], Sora ENYA[1], Hideshi INOUE[3], Yuta FUJIKAWA[3], Fumiaki YUMOTO[2], Toshiya SENDA[2], ○Ryusuke NIWA[1] ([1]Univ. Tsukuba, [2]KEK IMSS, [3]Tokyo Univ Pharm Life Sci)

昆虫発生過程の脱皮と変態の誘導には、「脱皮ホルモン」と呼称されるエクジステロイドが重要な役割を果たす。エクジステロイドは、昆虫体内においては特殊化した内分泌器官によって生合成されるが、ヒトを含む後口動物においては生合成されない。またエクジステロイド受容体も後口動物には存在しないと考えられている。よって、エクジステロイドの生合成や受容機構を阻害する化合物は、標的選択性が高く環境に調和した昆虫発育制御剤（IGR）になると期待される。しかし現在までに、エクジステロイド生合成を担う酵素や制御因子を標的とした化合物はほとんど知られていない。

このような中で我々は、エクジステロイド生合成に特異的に関与するグルタチオン *S*-転移酵素（GST）である Noppera-bo [1,2] をターゲットとした酵素活性阻害化合物の探索、およびその作用機序の解明を通じて、将来的な新しい IGR の発掘・開発を目指している[3]。現在までに我々は、組換え Noppera-bo タンパク質のグルタチオン抱合活性を、GST 活性検出蛍光プローブ 3,4-DNADCF を用いて高感度かつハイスループットに検出するアッセイ系を確立している [3]。このシステムを活用して我々は、キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster*、ハマダラカ *Anopheles gambiae*、そしてコナガ *Plutella xylostella* に由来する組換え Noppera-bo タンパク質のいずれに対しても *in vitro* で阻害活性を示す化合物を複数種類見出している。これらの化合物の中には、哺乳類女性ホルモンである β-エストラジオールが含まれる [4]。

今回我々は、Noppera-bo に対する化合物による酵素活性の阻害機序をさらに追究するために、Noppera-bo のアポ体および β-エストラジオールとの複合体の X 線結晶構造解析を行った。本発表では、現在までに得られた結果を元に、Noppera-bo と β-エストラジオールの相互作用の様式について議論し、Noppera-bo をターゲットとした創農薬に向けた基盤を議論したい。

[1] Enya et al. *Sci. Rep.* 4:6586, 2014.
[2] Enya et al. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 61: 1-7, 2015.
[3] 丹羽隆介. *化学と生物* 54: 508-513, 2016.
[4] Fujikawa et al. *Chem. Comm.* 51: 11459-11462, 2015.

ecdysteroid, glutathione S-transferase, insect growth regulator

発表責任者：丹羽隆介（ryusuke-niwa@umin.ac.jp）

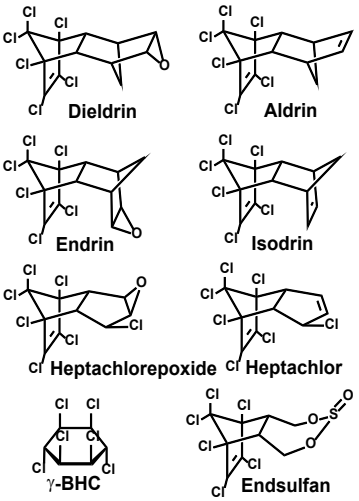
講演番号：4C13a09
講演日時：3 月 20 日 11:30～ C 校舎 13 会場

# ターゲットに変異をもつ Dieldrin 抵抗性昆虫に対する環状塩素系殺虫剤の作用

# Action of chlorinated cyclodiene insecticides on dieldrin resistant insects point mutated at their target

高市 成美[1]、松田 一彦[1]、尾添 嘉久[2]、○田中 啓司[1,3]（[1]近大農、[2]島根大生物資源、[3]名大 iMass 研）

Narumi Takaichi[1], Kazuhiko Matsuda[1], Yoshihisa Ozoe[2], ○Keiji Tanaka[1,3] ([1]Kindai Univ., [2]Shimane Univ., [3]Nagoya Univ.)




【目的】Dieldrin は GABA の非拮抗的アンタゴニストで、γ-BHC 同様、昆虫に対し抑制性神経伝達物質 GABA 受容体 $Cl^-$イオンチャンネル(GABA 受容体)に作用し、$Cl^-$イオンの透過性を阻害することによって興奮を誘起する。BHC には、α、β、γ、δ、ε 等の異性体が知られており、その中でγ-異性体（γ-BHC）のみが高い殺虫活性を示す。我々は“なぜγ-BHC にのみ高い殺虫活性が？”の謎に迫るべく研究に取り組んでいる。今回その研究の一環として、dieldrin に焦点を当て、GABA 受容体の $Cl^-$イオンチャンネル部分のアラニンがセリンに部分変異している dieldrin 抵抗性の OCR 系統イエバエを用いて、本化合物やその類縁の環状塩素系化合物、γ-BHC に対する殺虫活性の感受性系統との比較（抵抗性比）や、GABA 受容体との相互作用を検討したので報告する。

【方法】Dieldrin、γ-BHC 以外に endrin、isodrin、aldrin、heptachlor、heptachlor epoxide、endsulfan 等の環状塩素系化合物を供試し、感受性および抵抗性イエバエ（OCR）に対する殺虫活性、イエバエ頭部から調製した神経膜画分に対する[$^3$H]EBOB 結合阻害活性の評価を行った。殺虫活性評価と並行して aldrin、isodrin を処理したイエバエでの体内動態（代謝）や、イエバエの腹部から調製したミクロゾーム画分での酸化的代謝反応についても調べた。

【結果および考察】OCR 系イエバエに対し aldrin、isodrin、dieldrin、endrin、heptachlor、heptachlor epoxide、endsulfan そしてγ-BHC はいずれも交差抵抗性を示したが、その抵抗性比からこれらの化合物は大きく 2 グループに分けられた。Aldrin、dieldrin、heptachlor、heptachlorepoxide の抵抗性比は大きく、isodrin、endrin、endsulfan、γ-BHC は前グループの抵抗性比の 1/10 以下であった。GABA 受容体の非拮抗的アンタゴニストである [$^3$H]EBOB の感受性系統イエバエ頭部膜画分に対する結合阻害活性試験で、aldrin や isodrin のエポキシ体である dieldrin や endrin は対応する aldrin や isodrin に比べ数倍～10 倍ほど阻害活性が高く、同様の傾向は、OCR 系統イエバエに対する[$^3$H]EBOB 結合阻害実験でも認められた。Dieldrin とその異性体 endrin では、エポキシ基の位置が異なり、エポキシ基と GABA 受容体上のアラニン／セリン部分との直接の相互作用は OCR 系イエバエの抵抗性メカニズムには関与していないのではと推察される。

cyclodiene insecticide, γ-BHC, GABA receptor

発表責任者：田中啓司（tkeiji@nike.eonet.ne.jp）

講演番号：4C13a10
講演日時：3 月 20 日 11:45～ C 校舎 13 会場

ショウジョウバエ Dα1 -ヒヨコ β2 ニコチン性アセチルコリン受容体のネオニコチノイド感受性に対する Dα1 サブユニットの 3 loop の寄与
Contribution of three loops of Drosophila Dα1 subunit to neonicotinoid sensitivity of Dα1-chicken ß2 nicotinic acetylcholine receptor
○疋田 麻衣、山中 恭佑、松下 裕幸、古谷 章悟、伊原 誠、松田 一彦（近畿大・農）
○Mai HIKIDA, Kyousuke YAMANAKA, Hiroyuki MATSUSHITA, Shogo FURUTANI, Makoto IHARA, Kazuhiko MATSUDA (Fac. of Agri., Kindai Univ.)

【目的】イミダクロプリドをはじめとするネオニコチノイド系殺虫剤は昆虫のニコチン性アセチルコリン受容体（nAChR）に選択的に作用するが、そのメカニズムは完全には理解されていない。これまで、ネオニコチノイドの選択毒性の機構は nAChR の α サブユニットと non-α サブユニットの境界のオルトステリック部位との相互作用をもとに考えられてきた。今回ショウジョウバエ Dα1 サブユニットを用いて隣接する α サブユニット間のオルトステリック部位とネオニコチノイドの相互作用について検討したので報告する。

【方法と結果】Dα1 サブユニットとヒヨコ β2 サブユニットの cRNA を 5:1 あるいは 1:5 の比率で混合してアフリカツメガエル卵母細胞にマイクロインジェクションすることによって Dα1 サブユニット過剰および β2 サブユニット過剰の Dα1β2 ハイブリッド nAChR を発現させた。これらの nAChR を発現させた卵母細胞にアセチルコリンあるいはネオニコチノイドを処理したときに流れるイオン電流を膜電位固定法で測定し、ネオニコチノイドが誘起するイオン電流のピーク値を 10 μM のアセチルコリンが誘起するイオン電流のピーク値で規格化した。その値と化合物濃度との関係をもとに各化合物の半数効果濃度 $EC_{50}$ 値と最大活性化効率 Imax を求めた。

Dα1 サブユニットを過剰に含み Dα1-Dα1 境界面を持つ Dα1β2 nAChR では、Dα1 サブユニットの loop G の塩基性アミノ酸を脊椎動物の α4 サブユニットの対応するアミノ酸に置換すると Dα1β2 nAChR に対するネオニコチノイドの $EC_{50}$ 値が高濃度にシフトした。それに対して同受容体で loop E の塩基性アミノ酸を α4 サブユニットの対応するアミノ酸に置換するとネオニコチノイドの Imax 値が低下した。またこの変化は、loop G と E のアミノ酸置換に加えて loop D の酸性アミノ酸を α4 サブユニットの対応するアミノ酸に置換することによってより顕著になった。しかし、β2 サブユニットが過剰に発現した Dα1β2 nAChR ではこうしたアミノ酸置換の影響はほとんど認められなかった。ネオニコチノイドの場合とは対照的に、Dα1β2 nAChR に導入したアミノ酸置換はアセチルコリンの濃度応答関係に有意な影響を及ぼさなかった。

以上の実験結果は Dα1β2 nAChR とネオニコチノイドとが形成する複合体モデルで説明できることから、隣接する α サブユニットの境界のオルトステリック部位も nAChR のネオニコチノイド感受性の決定に関与することが示唆された。

neonicotinoids, nicotinic acetylcholine receptor, voltage clamp electrophysiology

発表責任者：松田一彦（kmatsuda@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：4C13a11
講演日時：3 月 20 日 12:00～ C 校舎 13 会場

# ウンシュウミカン幼果由来のテルペン類を利用したミカンバエの誘引法の開発

# Development of a method for attracting citrus pest fruit fly *Bactrocera tsuneonis* using terpenoids from young fruit of *Citrus unshiu*

○大竹 潤[1]、東浦 祥光[2]、大野 慧[1]、吉永 直子[1]、森 直樹[1]、西田 律夫[1]、小野 肇[1] ([1]京大院農、[2]山口県農林総合技術センター)

○Jun OTAKE[1], Yoshimitsu HIGASHIURA[2], Satoshi OHNO[1], Naoko YOSHINAGA[1], Naoki MORI[1], Ritsuo NISHIDA[1], Hajime ONO[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Yamaguchi Prefectural Technology Center for Agriculture and Forestry)

【背景と目的】

ミカンバエ（*Bactrocera tsuneonis*）は日本国内に生息する柑橘類の害虫である．雌成虫は果実に産卵し，孵化した幼虫が果肉を食害する．その分布は近年，九州地方に加え中国・四国地方まで広がっている．発生地域では柑橘類の国内流通に支障を来し，国外輸出は制限されるため，その防除は喫緊の課題である．これまでにシトロネラ油やプロテイン剤を用いた誘引トラップにミカンバエが誘引される事例が知られている．そのため発生予察に利用する試みがなされているが，他のミバエ類に見られるような強力なトラップの実用化には至っていない．そこでより有効な誘引法の開発を目的としてシトロネラ油やウンシュウミカン（*Citrus unshiu*）幼果から誘引物質を探索した．

【方法と結果】

シトロネラ油に対するミカンバエの成虫の触角応答を GC-EAD により解析した．その結果，雌雄共にリモネンやシトロネロール等のモノテルペンへの応答が確認された．次にミカン幼果の香気成分を固相マイクロ抽出法にて捕集し，GC-MS で分析した．モノテルペン類に加えカリオフィレンや β-エレメン等のセスキテルペン類が検出された．これらの主要な化合物について室内誘引試験を行った．しかしいずれの化合物についても誘引活性は認められなかった．一方でミカン幼果を模した緑色のピンポン玉を提示すると，幼果由来の香気成分の存在下で雌雄共にピンポン玉に登る行動が観察された．雌成虫では産卵行動を示す個体も認められた．ミカン幼果由来のテルペン類は各成分単体では誘引活性は示さないが，雌成虫に対して産卵活性を有することが明らかとなった．

テルペン類及びプロテイン剤を用いて野外誘引試験を実施した．しかしテルペンを誘引源としたトラップにはミカンバエは捕獲されなかった．プロテイントラップではミカンバエが一頭捕獲され，他に近縁種のミバエや多数のニクバエ類が捕獲された．ニクバエの混入はミバエの調査作業の妨げになるが，プロテイン剤にテルペンを添加すると捕獲されたニクバエ類の数が減少した．今回使用したテルペンにはニクバエ類に対する忌避作用があると考えられるため，プロテイン剤と組み合わせて使用することでミバエ類を選択的に誘引するトラップの開発が期待される．



ピンポン玉に産卵管を刺すミカンバエ雌成虫

Japanese orange fly *Bactrocera tsuneonis*, pest management, oviposition stimulant

講演番号：4C14a01
講演日時：3 月 20 日 09:20～ C 校舎 14 会場

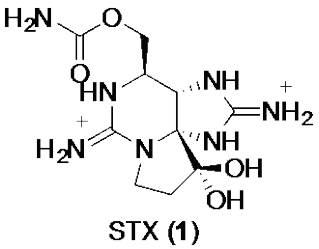
# 有毒藍藻 *Anabaena circinalis*(TA04)からの未知麻痺性貝毒サキシトキシン類縁体の探索

# Screening of novel analogues of paralytic shellfish toxins in the toxic cyanobacterium *Anabaena circinalis* (TA04)

○美野輪 高之[1]、長 由扶子[1]、土屋 成輝[1]、此木 敬一[1]、大島 泰克[2]、山下 まり[1] ([1]東北大院農、[2]東北大院生命)

○ TAKASHI MINOWA[1], YUKO CHO[1], SHIGEKI TSUCHIYA[1], KEIICHI KONOKI[1], YASUKATSU OSHIMA[2], MARI YAMASHITA[1] ([1]Tohoku Univ.Agri., [2]Tohoku Univ.Life Sci.)

【背景・目的】




サキシトキシン(Saxitoxin, STX, **1**)に代表される麻痺性貝毒(Paralytic Shellfish Toxins, PSTs)は、強力な電位依存性$Na^+$チャネル阻害物質である。PSTsの生合成経路は、有毒淡水産藍藻や海産渦鞭毛藻を用いた取り込み実験や[1]、藍藻から発見された推定生合成遺伝子から推定されたが[2]、化学的な証明が十分ではなかった。我々は、これまで推定生合成中間体の合成と同定を行い、新たな生合成経路を提唱した[3]。本研究では、さらなるPSTsの生合成や代謝に関する情報を得るために、有毒藍藻*Anabaena circinalis* (TA04)より未知のPSTs類縁体を探索したので報告する。

【方法・結果】

*A. circinalis* (TA04)を液体培養し、収穫した細胞の抽出物を活性炭処理し、LC/MSで未知のPSTs関連化合物を探索した。その結果、数種の未知の類縁体の存在が示された。まず、 未知ピーク1は、種々検討の結果、STXのモノ硫酸エステル体の還元体ではないかと考えられた。そこで、予想された化合物を、本藍藻培養液から得られたSTX類縁体のC1/C2より化学誘導し、$^1$H NMRで構造を確認した。この合成標品とLC/MSで比較し、未知ピーク１を同定することができた。この類縁体が天然に存在することは本研究で初めて明らかになった。さらに、未知ピーク2は、LC/MSの保持時間やMS/MSフラグメントパターンから、既報の類縁体であることが示唆されたが、この類縁体はこれまで二枚貝以外から報告されていない。今後、この成分も化学誘導し、さらに証明する予定である。

【References】

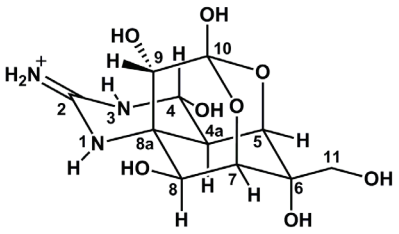
1) Y. Shimizu, C. P. Hsu, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1981**, *7*, 314-315.
2) R. Kellmann, T. K. Mihali, Y. J. Jeon, R. Pickford, F. Pomati, B. A. Neilan, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2008**, *74*, 4044-4053.
3) S. Tsuchiya, Y. Cho, K. Konoki, K. Nagasawa, Y. Oshima, M. Yotsu-Yamashita, *Sci. Rep.*, **2016**, *6*, 20340.

paralytic shellfish toxins, saxitoxin, cyanobacteria

講演番号：4C14a02
講演日時：3 月 20 日 09:35～ C 校舎 14 会場

フグにおける新規テトロドトキシン関連化合物の探索
Screening of novel tetrodotoxin related compounds in pufferfish
○上山 望、杉本 敬太、長 由扶子、此木 敬一、山下 まり（東北大院農）
○Nozomi Ueyama, Keita Sugimoto, Yuko Cho, Keiichi Konoki, Mari Yotsu-Yamashtia (Tohoku Univ.)

**[背景]** テトロドトキシン (Tetrodotoxin, TTX, **1**) は電位依存性ナトリウムチャネルに対する強力な阻害剤であり、フグを始めとする海洋生物や陸棲の両生類に含まれることが知られている。その一方で生合成経路・代謝経路は未だ解明されておらず、強力な生理活性と高度に架橋した構造から興味が持たれる。当研究室では TTX 生合成経路の解明に向け、多くの新規 TTX 類縁体を探索してきた [1)]。その結果、有毒イモリから 10-hemiketal 型 TTX 類縁体や二環性の環状グアニジン化合物を単離し、その骨格構造から陸棲生物においては TTX がモノテルペン由来であることが示唆された [2)]。さらに、昨年度の本大会では海洋生物から得られた TTX 推定生合成中間体を報告した。本研究では、引き続き海洋生物から TTX 推定生合成中間体の探索を行ったのでこれを報告する。



TTX(1)

**[方法]** 高濃度の TTX を保有するフグの抽出物を LC-MS/MS を用いて精査したところ、TTX 推定生合成中間体と考えられる分子式を示す微量新規成分が数種検出された。これらの微量成分を各種クロマトグラフィーにより単離・精製し、高分解能 ESI-TOF-MS と各種 NMR を用いて構造解析を行った。

**[結果・考察]** 構造解析の結果、今回得られた微量成分はいずれも含グアニジン 6 員環を有する二環性化合物であることが判明した。また、これら化合物は TTX が高度に還元された構造を有しており、既知類縁体と大きく異なる構造であった。その特徴的構造から TTX 生合成経路を解明する手がかりになると考えられた。

**[References]**

1 a) Yotsu-Yamashita, M.; Abe, Y.; Kudo, Y.; Riston-Williams, R.; Paul, V. J.; Konoki, K.;Cho, Y.; Adachi, M.; Imazu, T.; Nishikawa, T.; Isobe, M. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 2799–2813. b) Kudo, Y.; Finn, J.; Fukushima, K.; Sakugawa, S.; Cho, Y.; Konoki, K.; Yotsu-Yamashita, M. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 1000–1004.

2 a) Kudo, Y.; Yamashita, Y.; Mebs, D.; Cho, Y.; Konoki, K.; Yasumoto, T.; Yotsu-Yamashita M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 14546–14549. b) Kudo, Y.; Yasumoto, T.; Mebs, D.; Cho, Y.; Konoki, K.; Yotsu-Yamashita, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 8728–8731.

tetrodotoxin, pufferfish, biosynthesis

発表責任者：山下まり（myama@biochem.tohoku.ac.jp）

講演番号：4C14a03
講演日時：3 月 20 日 09:50～ C 校舎 14 会場

記憶喪失性貝毒ドウモイ酸新規関連化合物の探索
Screening of novel compounds related to domoic acid, amnestic shellfish toxin
○海老根 優香理[1]、小瀧 裕一[2]、寺田 竜太[3]、長 由扶子[1]、此木 敬一[1]、山下 まり[1] ([1]東北大院農、[2]北里大海洋、[3]鹿児島大院連合農)
○ Yukari Ebine[1], Yuichi Kotaki[2], Ryuta Terada[3], Yuko Cho[1], Keiichi Konoki[1], Mari Yotsu-Yamashita[1] ([1]Tohoku Univ, [2]Kitasato Univ, [3]Kagoshima Univ)

【背景・目的】ドウモイ酸(Domoic acid, DA, Figure 1)は、中枢神経伝達物質 L-グルタミン酸受容体のアゴニストとして、神経細胞のイオンチャネル型グルタミン酸受容体に結合し、受容体を活性化する。その結合はグルタミン酸より極めて強いため、ヒトが摂取し、DA が大量に脳に侵入した場合、海馬などのグルタミン酸受容体に強固に結合し、過度の活性化が起こる。その結果、細胞死が起こり記憶喪失などの症状を引き起こす。DA は珪藻 *Pseudo-nitzschia multiseries* などが生産し、二枚貝などに蓄積される。そのため、記憶喪失性貝毒(ASP)とも呼ばれる。これまで、多種の DA の異性体が報告され[1,2]、さらに、ゲラニル二リン酸とグルタミン酸から生合成されることも報告された(Figure 1)[3]。しかし、DA の生合成経路において、環化機構や酸化の順番は未解明である。本研究では、生合成機構の詳細を解明するために、新規 DA 関連化合物を探索したので報告する。

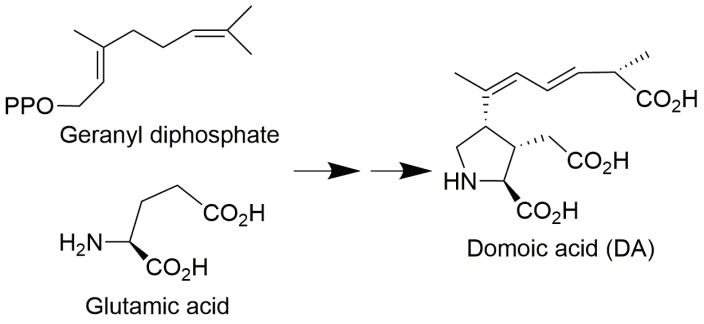


Figure 1. Predicted precursors for the biosynthesis of DA[3]

【方法】LC-MS/MS を用いて、DA 関連化合物を探索した。関連物と思われる化合物は各種カラムクロマトグラフィーにより単離し、HR-ESI-MS と各種 NMR 測定により構造解析した。
【結果】今回の探索で、数種の微量の DA 関連化合物が得られ、それらの平面構造を推定した。その結果、これらは新規の DA 生合成中間体と考えられた。その中の一種の化合物については現在、立体化学決定のために化学合成を試みている。これらの化合物の構造に基づき、DA 生合成経路の未解明の部分を推定した。

【References】

1) Quilliam, M. A., Manual on Harmful Marine Microalgae, Monographs on Oceanographic Methodology, Vol. 11, Chapter 9. Intergovernmental Oceanographic Commission (UNESCO), Paris, 247–266, **2003**.
2) Kotaki, R. *et al*., *Toxicon* 46, 946–953, **2005.**
3) Douglas, D. J. and Wright, L. C. J. *et al*., *J. Chem. Soc., Chem. Commun*. 9, 714–716, **1992.**

domoic acid, biosynthesis, amnestic shellfish poisoning

発表責任者：山下まり（myama@biochem.tohoku.ac.jp）

講演番号：4C14a04
講演日時：3 月 20 日 10:05～ C 校舎 14 会場

テルペン環化酵素の機能改変とアイソトポマーを用いた反応機構解析
Functional modification of a terpene cyclase and reaction mechanism analysis using isotopomers
○中川 和也、夏目 雅裕、川出 洋（東京農工大院農）
○Kazuya Nakagawa, Masahiro Natsume, Hiroshi Kawaide (Institute of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology)

【研究背景・目的】
テルペノイドは天然に広く存在し、多様な生理活性物質を持つ化合物群として知られている。植物、動物、昆虫のホルモンに加え、細胞分化誘導や細胞構成成分など、生命に必須な化合物が多く含まれる。また、植物や微生物が生産するテルペノイドには、抗がん活性や抗マラリア活性などを有する薬剤開発において重要な化合物が多く存在する。近年、テルペンの生合成を担う酵素の同定例は増えつつあるが、その詳細な反応メカニズムを明らかにした例は多くない。複雑な反応を伴う生合成酵素の反応メカニズムを理解することができれば、有用テルペンを人工的に合成する手がかりが得られると共に、酵素が行う複雑で精密な生命現象の解明に繋がる。
【研究概要】
当研究室において確立しているテルペノイド酵素合成法を応用し [1,2]、一部のイソプレンユニットのみを $^{13}C$ で標識した isoprene unit isotopomers(IUI)を作成した。我々は IUI を用いて微生物由来のジテルペン環化酵素が行う反応機構の解析を行い、複数のテルペン環化酵素が共通の反応機構を有することを示してきた [3]。これらの基質側からのアプローチに対し、本発表では酵素側からのアプローチについて報告する。具体的には麹菌（*Aspergillus oryzae*）から見出したテルペン環化酵素（AoDSL）をテンプレートとして、上述した共通の環化反応に関与すると推測されるアミノ酸残基に変異を導入した。その結果、特定の変異体から複数の新たなジテルペン化合物の生産を確認したため、$^{13}C$ 標識体の合成と多次元 NMR による構造解析を行った。またこれら新規化合物に対しても IUI を作成し、変異導入によって環化反応機構がどのように変化したのかを確かめることで触媒機構に関するより詳細な解析を行っている。これら一連の実験から得られたジテルペン環化酵素が行う環化反応機構に関する知見を総動員し、新たな骨格をもたらす機能改変型酵素の論理的な創製に繋げたいと考えている。
1)Sugai, Y. *et al., Biosci. Biotechnol. Biochem.*(2011)**75**, 128
2)Sugai, Y. *et al., J. Biol. Chem.*(2011)**286**, 42840
3)日本農芸化学会 2016 年度大会（札幌）3B032

terpene cyclase, 13C isotope

講演番号：4C14a05
講演日時：3 月 20 日 10:20～ C 校舎 14 会場

# mRNA 成熟阻害活性を持つフラボノイドの作用機序の解明

# The elucidation of the mechanism by which flavonoids inhibit mRNA processing

○倉田 雅志[1,2]、増田 誠司[2] ([1]名市大医、[2]京大生命)
○Masashi KURATA[1,2], Seiji MASUDA[2] ([1]Nagoya City Univ., [2]Kyoto Univ.)

超高齢社会を迎えた現在、日本人の３人に１人はがんによって死亡している。がん治療には手術や化学療法、放射線治療などがあるが、いずれも機能障害や副作用を伴い、中でも化学療法は重篤な副作用により治療が中断となるケースが多いため副作用の少ない化合物の探索、開発が急務である。

真核生物において、核内の DNA にあるタンパク質の情報が RNA ポリメラーゼⅡによって pre-mRNA に転写され、５’末端の RNA キャップ形成、スプライシング、３’末端のポリアデニル化といった成熟過程を正常に受けた mRNA のみが細胞質へと輸送され、タンパク質へと翻訳される。近年様々ながん抑制の作用機序が発見されているが、その一つに mRNA の成熟過程の一つであるスプライシングがあげられる。例えば SSA、GEX1A などの化合物はスプライシングを阻害することで mRNA の成熟過程を阻害する。結果として、がん細胞の増殖を抑制することが期待されている。

本研究では、食品由来成分より核内の mRNA プロセシングを阻害する化合物を探索した。手法として、核内での mRNA 成熟が阻害されると mRNA が核内に蓄積することを利用して、ヒト骨肉腫細胞に候補化合物を添加して mRNA の核内局在を RNA-Fluorescence in situ hybridization (RNA-FISH)を用いて観察した。その結果、野菜や果物に含まれるフラボノイドに mRNA 成熟阻害活性を見出した。さらに詳細な構造活性相関解析を行い、各種フラボノイドの活性を評価した。その結果、強い mRNA 成熟阻害活性を持つ因子がアピゲニン、ルテオリン、クリシンに集約されることを見出した。構造活性相関解析からフラボノイド A 環の２個の OH 基が必要であること、逆に C 環の OH 基は効果が大きく減弱すること、B 環には２個までの OH 基が活性に必須であることを見出した。次いで、アピゲニン、ルテオリン、クリシンを添加した細胞は、核内に mRNA の蓄積した特徴的な foci を形成した。これは mRNA スプライシングを阻害した時に現れる顕著な表現系であった。そこで foci の局在場所を観察したところ、核スペックルに局在した。この現象は、これらフラボノイドによって mRNA スプライシングが阻害された可能性が極めて高いことがわかった。現在、これら化合物の作用機序を明らかにするために網羅的な遺伝子解析を進めている。

本研究において食品由来成分のフラボノイドによる mRNA スプライシング阻害の解明が進むことにより、がんを抑制する分子機構の一端を明らかにできるのではないかと期待している。

favonoids, mRNA processing, RNA-FISH

発表責任者：倉田　雅志（masashikurata@gmail.com）

講演番号：4C14a06
講演日時：3 月 20 日 10:35～ C 校舎 14 会場

# 合成ユビキノンは出芽酵母ミトコンドリア電位依存性アニオンチャンネル（VDAC）に特異的に結合する

# Synthetic ubiquinones specifically binds to voltage-dependent anion channel (VDAC1) in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria

○村井 正俊[1]、奥田 絢香[1]、山本 武範[2]、篠原 康雄[2]、三芳 秀人[1]([1]京大院・農学研究科、[2]徳島大・先端酵素学研究所)
○Masatoshi MURAI[1], Ayaka OKUDA[1], Takenori YAMAMOTO[2], Yasuo SHINOHARA[2], Hideto MIYOSHI[1] ([1]Graduate School of Agriculture, Kyoto University, [2]Institute for Genome Research, Tokushima University)

【背景・目的】ユビキノンに代表されるキノン類は、呼吸鎖電子伝達系における電子伝達担体としてはたらき、バクテリアから高等生物に至るまで幅広く分布する生理活性分子である。一方、最近の研究では、電子伝達には直接関与しないものの、ユビキノンを“補因子”として持つことで機能する「ユビキノン結合性タンパク質」の存在が幾つか示唆されている。ミトコンドリア外膜に存在する電位依存性アニオンチャンネル（VDAC）は、そうしたユビキノン結合性タンパク質の候補の一つであり、いわゆる膜透過性亢進と呼ばれるシトクロム *c* の細胞質への漏出など、アポトーシスの鍵現象に深く関与することが知られているが、両者の相互作用を明確に実証した例はこれまでにない。本研究では、出芽酵母ミトコンドリアを実験材料として、独自に合成したユビキノンプローブを用いた光親和性標識実験を切り口に、VDAC とユビキノンの関係を明らかにすることを目的とした。

【結果】ユビキノンのキノン環とイソプレン側鎖末端に、アジド基とアルキンをそれぞれ導入したユビキノンプローブを合成した（PUQ-1、図 1)。本化合物は光親和性標識実験後に、クリックケミストリー（[3+2]-環化付加反応）を利用して蛍光発色団やビオチンなどの任意の検出タグを導入することを意図している。出芽酵母から単離したミトコンドリアを、UQ-1 によって光親和性標識し、クリックケミストリーによって蛍光発色団(TAMRA-azido tag, 図1)を導入して標識タンパク質の解析を進めた結果、 PUQ-1 は VDAC1 に特異的に結合していることを明らかにした。さらに、プロテアーゼ限定分解によって、PUQ-1 の結合部位は VDAC1 の C 末端付近の Phe221-Lys234 に存在することを明らかにした。

ユビキノンと VDAC の相互作用の生理的な意義を考察する目的で、出芽酵母ミトコンドリアの膜透過性亢進におけるユビキノンの影響について精査した。その結果、PUQ-1 は $Ca^{+}$で誘導される膜透過性亢進を低濃度で抑制した。発表者らの一連の実験結果は、ユビキノンと VDAC1 の相互作用を初めて直接的に実証したものであり、ユビキノンが VDAC に特異的に結合することで膜透過性亢進が制御されることを示唆するものである。

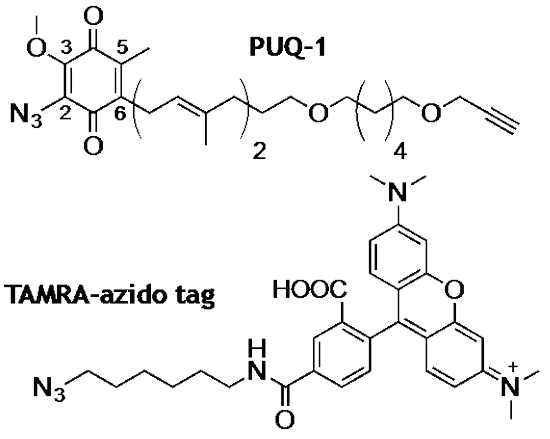


**図 1. ユビキノンプローブ（UQ-1）とタグの構造**

ubiquinone, voltage-dependent anion channel, photoaffinity labeling

講演番号：4C14a07
講演日時：3 月 20 日 11:00～ C 校舎 14 会場

# ミトコンドリア呼吸鎖複合体-I の位置特異的化学修飾

# Site-specific chemical modification of mitochondrial respiratory complex I

○桝谷 貴洋、村井 正俊、三芳 秀人（京大農）
○Takahiro Masuya, Masatoshi Murai, Hideto Miyoshi (Kyoto Univ.)

【背景・目的】ミトコンドリア呼吸鎖電子伝達系の初発酵素である NADH-キノン酸化還元酵素（呼吸鎖複合体-I）は、基質の酸化還元と共役したプロトン輸送を行う膜タンパク質複合体である。2013 年に好熱細菌（*Thermus thermophilus*）複合体-I の X 線結晶構造が解かれ、複合体-I のキノン結合ポケットでの構造変化がプロトン輸送の駆動力になっている可能性が示唆された。当研究室では、蛍光発色団やマイクロビーズなどを駆使した“一分子計測法”で複合体-I の構造変化を観察することを将来的な目標に見据え、複合体-I のキノン結合ポケットを任意の分子で特異的に修飾する方法論の確立を進めてきた。これまでにタンパク質化学修飾法である“トシル化学”に着目し、阻害剤をモチーフとしたリガンド分子（AL1, 図 1）を用いて、キノン結合ポケットの最深部を構成する 49 kDa サブユニットの 160 番目のアスパラギン酸(49 kDa-Asp160)に 1 次タグとなる末端アジドを特異的に導入し、これを足場として、歪んだ環状アルキンを持つ蛍光基(TAMRA-DIBO, 図 1)を 2 次タグとして導入することに成功している。しかしながら、TAMRA-DIBO を用いて 2 次タグを導入する場合、アジド化されたアミノ酸残基以外の複数のアミノ酸残基が TAMRA-DIBO と反応することが解決すべき課題であった。そこで、トシル化学における特異性の向上を目指して、新たな 1 次および 2 次タグの検討を行った。

【方法・結果】環歪みを持つアルケンは触媒を用いることなくテトラジンと水中で反応することが知られている（inverse-electron-demand Diels-Alder cycloaddition)。そこで、複合体-I に導入する 1 次タグとして環歪みを持つアルケンに着目し、3 種類のリガンド分子 AL2～AL4（図 1）を合成した。ウシ心筋亜ミトコンドリア粒子と AL 類を 37℃で 24 時間インキュベートすることで 1 次タグを導入し、蛍光基 BODIPY をもつテトラジン（BODIPY-tetrazine, 図 1）を 2 次タグとして反応させた。SDS-PAGE により BODPY 由来の蛍光を観察したところ、AL4 を用いた場合に 49 kDa サブユニットのみから強い蛍光が観察され、副反応はほとんど見られなかった。

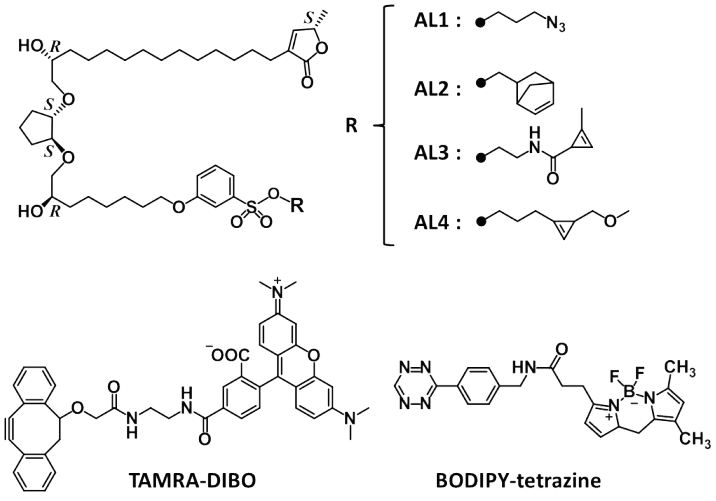



図 1. 使用した化合物の構造

mitochondrial respiratory complex I, ligand-directed tosyl chemistry, chemical modification

講演番号：4C14a08
講演日時：3 月 20 日 11:15～ C 校舎 14 会場

# コレラ菌 NADH-キノン酸化還元酵素の阻害剤コロルミシンの単離と全合成研究

# Isolation and total synthesis of korormicin, an inhibitor of sodium-translocating NADH-quinone oxidoreductase from Vibrio cholerae

○伊藤 剛[1]、戸崎 龍彦[1]、村井 正俊[1]、BARQUERA Blanca[2]、三芳 秀人[1] ([1]京大院・農、[2]レンセラー工科大学・生物科学)

○ Takeshi ITO[1], Tatsuhiko TOSAKI[1], Masatoshi MURAI[1], Blanca BARQUERA[2], Hideto MIYOSHI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Rensselaer Polytechnic Institute)

【背景・目的】$Na^+$輸送型 NADH-キノン酸化還元酵素($Na^+$-NQR)は、基質の酸化還元と共役してナトリウムイオンの能動輸送を行う膜タンパク質複合体である。本酵素はコレラ菌（*Vibrio cholerae*)に代表されるビブリオ属細菌や一部の病原性細菌など、ATP 合成の駆動力として $Na^+$の濃度勾配を利用する微生物に特有の NADH 脱水素酵素であり、哺乳類ミトコンドリア呼吸鎖の $H^+$輸送性 NADH-ユビキノン酸化還元酵素（呼吸鎖複合体-I）とは、構造的にも進化的にも全く異なる酵素である。したがって、$Na^+$-NQR の選択的阻害剤は病原性細菌に対する新規な医薬シーズとなる可能性を秘めている。$Na^+$-NQR の阻害剤としては、オーラシン類縁体の HQNO と、海洋細菌(*Pseudoalteromonas* sp.)の二次代謝物であるコロルミシン（図 1）が報告されている。しかし、HQNO の阻害活性は μM オーダーとさほど強くなく、$Na^+$-NQR 以外の呼吸鎖酵素に対しても顕著な阻害を示すことが知られている。一方、コロルミシンは $Na^+$-NQR を極めて特異的かつ強力に阻害することが報告されていたが[*1*]、東日本大震災の被害によってサンプルが失われた。本研究では、$Na^+$-NQR 阻害剤としてのコロルミシンに注目し、海洋細菌からコロルミシンを単離してコレラ菌 $Na^+$-NQR に対する阻害活性を評価すると同時に、構造-活性相関研究を見据えた全合成研究を行った。

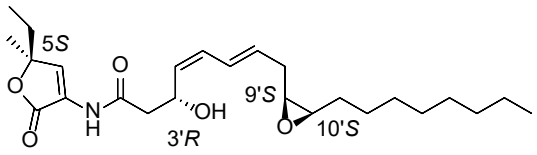



**図 1 コロルミシンの構造**

【方法・結果】コロルミシンは、2 級水酸基とエポキシ基を含む不飽和アルキルとγ-ラクトン環がアミド結合を介して連結した特徴的な構造をとり、その分子内には 4 つの不斉炭素が存在する（図 1）。*Pseudoalteromonas* J010 株 のエタノール粗抽出物について、水／エーテル分配抽出、シリカゲルクロマトグラフィー、逆相分取 HPLC によって活性画分の精製を行い、湿重量 22 g の菌体から 5.6 mg のコロルミシンを単一物として得た。得られたコロルミシンの $Na^+$-NQR に対する阻害活性を評価したところ、その $IC_{50}$値は 5 nM となり、HQNO よりも 400 倍ほど強力であった。これと並行して、小林らの方法を参考に[*2*]、立体選択的なコロルミシンの全合成経路を確立した。合成コロルミシンの $^1H$, $^{13}C$-NMR および旋光度は天然物と一致し、$Na^+$-NQR に対する阻害活性も同一であることを確認した。

参考文献 1) Nakayama et al. *Biol. Pharm. Bull.* 22, 1064-1067 (1999). 2) Kobayashi et al. *Eur. J. Org. Chem*. 1873-1881 (2001).

sodium-translocating NADH-quinone oxidoreductase, korormicin, Vibrio cholerae

講演番号：4C14a09
講演日時：3 月 20 日 11:30～ C 校舎 14 会場

# Aplysiatoxin 単純化アナログ・10-Me-aplog-1 のフェノール性側鎖が各種生物活性に与える影響

# Effects of the phenolic group in the side chain of 10-Me-aplog-1, a simplified analog of aplysiatoxin, on its biological activities

○花木 祐輔[1]、菊森 将之[1]、徳田 春邦[1]、岡村 睦美[2]、旦 慎吾[2]、柳田 亮[3]、入江 一浩[1]([1]京大院農、[2]がん研、[3]香川大農)

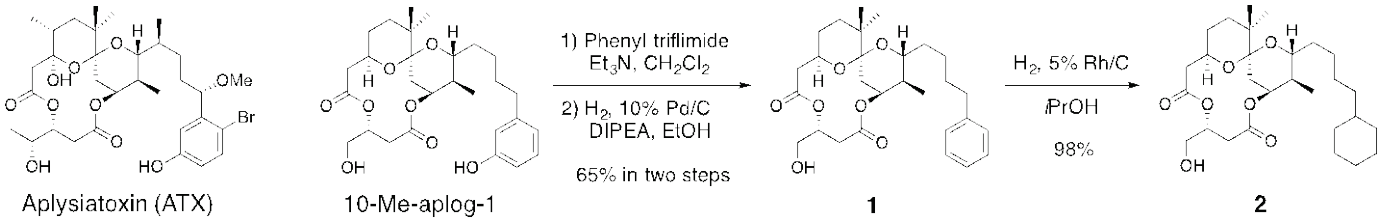
○Yusuke HANAKI[1], Masayuki KIKUMORI[1], Harukuni TOKUDA[1], Mutsumi OKAMURA[2], Shingo DAN[2], Ryo YANAGITA[3], Kazuhiro IRIE[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Cancer Chemotherapy Center, [3]Kagawa Univ.)

【背景・目的】

Aplysiatoxin（ATX）は，プロテインキナーゼ C（PKC）アイソザイムの C1 ドメインに結合することによって，これらを強力に活性化する．ATX は特定のがん細胞株の増殖を抑制するが，発がん促進性ならびに炎症性といった副作用を示すため治療薬としての応用が困難であった．本研究グループでは，ATX の PKC 結合能およびがん細胞増殖抑制能を保持したまま，副作用を選択的に取り除いた単純化アナログ・10-Me-aplog-1 の開発に成功している（Kikumori, M. *et al*., *J. Med. Chem*. **2012**, *55*, 5614）．最近，ATX と PKCδ-C1B ドメインとのドッキングシミュレーションの結果，ATX のフェノール性側鎖が PKCδ-C1B の Met-239 (-C=O) と相互作用することが示唆された（Ashida, Y. *et al*., *Bioorg. Med. Chem*. **2016**, *24*, 4218）．そこで本研究では，10-Me-aplog-1 のフェノール性側鎖の修飾体（**1**, **2**）を合成し，各種生物活性を調べた．

【方法・結果】

10-Me-aplog-1 のフェノール性水酸基を除去した **1**，さらにベンゼン環を還元した **2** を合成し，PKCδ-C1B に対する結合能を評価した．その結果，10-Me-aplog-1 と比べて **1** は約 2 倍，**2** は約 8 倍結合能が低かったことから，側鎖のフェノール性水酸基ならびにベンゼン環が PKCδ-C1B との結合に関与していることが判明した．しかしながら，39 種のがん細胞株に対する増殖抑制試験において，**1** および **2** の増殖抑制活性は 10-Me-aplog-1 とほぼ同等であった．さらに，マウス耳介炎症試験ならびにマウス皮膚二段階発がん試験を行い，*in vivo* における炎症活性および発がん促進活性を評価したところ，**1** は 10-Me-aplog-1 と同様にこれらの活性が低かったのに対し，**2** は有意な炎症性と発がん促進性を示した．PKCδ は，発がんの抑制に関与するアイソザイムの一つであることから，10-Me-aplog-1 のフェノール性水酸基ならびに芳香環は，PKCδ-C1B との結合により，炎症性ならびに発がん促進性といった副作用を低減させている可能性が示唆された．




protein kinase c, tumor-promoter, Aplysiatoxin

発表責任者：入江　一浩（irie@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4C14a10
講演日時：3 月 20 日 11:45～ C 校舎 14 会場

# 漢方由来 ウンカリン酸 C によるアミロイドβ42 核形成阻害メカニズム

# Inhibitory mechanism of uncarinic acid C against the nucleation phase in amyloid β 42 aggregation

○吉岡 卓也[1]、村上 一馬[1]、花木 瑞穂[1]、緑川 諭弘[2]、谷脇 慎治[2]、郡司 祐樹[2]、川瀬 泰司[3]、廣瀬 賢治[3]、入江 一浩[1] ([1]京大院農、[2]アルプス薬品工業、[3]日本ウォーターズ)

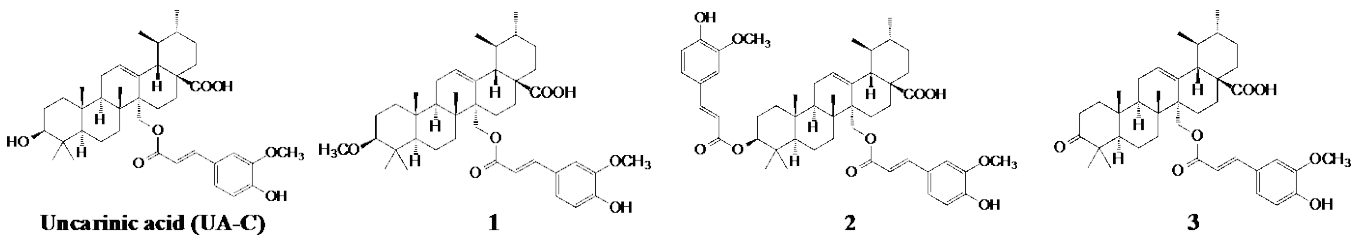
○Takuya YOSHIOKA[1], Kazuma MURAKAMI[1], Mizuho HANAKI[1], Satohiro MIDORIKAWA[2], Shinzi TANIWAKI[2], Hiroki GUNZI[2], Taizi KAWASE[3], Kenzi HIROSE[3], Kazuhiro IRIE[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Alps-Pharmaceutical Industry, [3]Nihon Waters K. K.)

**【背景・目的】**高い凝集性をもつ 42 残基のアミロイドβタンパク質（Aβ42）は，アルツハイマー病（AD）の原因物質と考えられており，凝集過程の初期段階で生じるオリゴマーが神経細胞毒性を示す．Aβ42 の凝集過程は，多様な低分子オリゴマー（2~24 量体 : 2 or 3 x *n*-mer）が混在する「核形成過程」と，それに引き続く低毒性のβシート構造に富んだアミロイド線維を形成する「線維伸長過程」に大別される．このことより，核形成過程を選択的に阻害する薬剤は AD 創薬において有望である．最近，本研究グループは抑肝散の構成生薬の一つであるチョウトウコウから，核形成過程を特異的に阻害する uncarinic acid C（UA-C）を単離・同定した.[1)] UA-C はトリテルペンアルコールとフェルラ酸が結合したエステルであり，新しいタイプの Aβ42 凝集阻害物質である．UA-C の 27, 28 位における各種誘導体の合成により，27 位のフェルラ酸エステルおよび 28 位のカルボキシ基が阻害活性に不可欠であることを明らかにした.[1)] 本研究では，さらに 3 位ヒドロキシ基の構造活性相関と，Aβ42 の細胞毒性に対する UA-C の影響ならびにその作用機序について調べた．

**【方法・結果】**UA-C の 3 位誘導体 3 種［メトキシ体（**1**），フェルラ酸エステル体（**2**），ケトン体（**3**）］を，UA-C の 28 位アルデヒド体を共通中間体としてそれぞれ合成し，凝集能への影響をチオフラビン T 試験で調べた．その結果，**1** と **2** の核形成阻害活性は低下したが，**3** は UA-C と同程度の阻害活性を示したことより，3 位のかさ高い置換基が阻害活性を低下させることが判明した．また，ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y を用いた MTT 試験の結果，UA-C は Aβ42 の細胞毒性を緩和するだけでなく細胞保護作用を示した．さらに，ナノエレクトロスプレー質量分析において，Aβ42 と UA-C とのイオン結合による付加体が観測された．

以上より，UA-C は Aβ42 の凝集初期段階を標的とし，イオン結合を介して毒性オリゴマーの生成を阻害しているものと考えられる．

**【文献】**1) Yoshioka, T. *et al.*, *J. Nat. Prod.*, **2016**, *79*, 2521.




Amyloid β, Aggregation, Kampo

発表責任者：入江一浩（irie@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4C14a11
講演日時：3 月 20 日 12:00～ C 校舎 14 会場

# アミロイドβ40 の毒性オリゴマーモデル

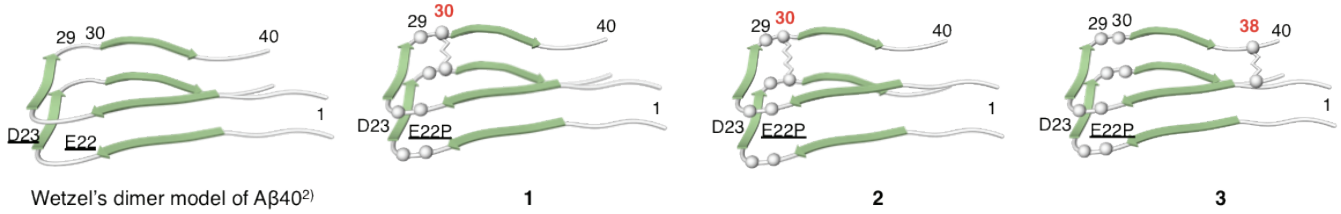
# Synthetic models of toxic amyloid ß oligomers

○入江 由美[1]、村上 一馬[1]、花木 瑞穂[1]、花木 祐輔[1]、鈴木 天志[1]、物部 容子[2]、高井 朋代[2]、赤木 謙一[2]、川瀬 泰司[3]、廣瀬 賢治[3]、入江 一浩[1] ([1]京大院農、[2]医薬基盤研究所、[3]日本ウォーターズ株式会社)

○Yumi IRIE[1], Kazuma MURAKAMI[1], Mizuho HANAKI[1], Yusuke HANAKI[1], Takashi SUZUKI[1], Yoko Monobe[2], Tomoyo TAKAI[2], Ken-ichi AKAGI[2], Taiji KAWASE[3], Kenji HIROSE[3], Kazuhiro IRIE[1] ([1]Kyoto Univ., [2]National Institute of Biomedical Innovation, Health and Nutrition, [3]Nihon Waters K. K.)

**【背景と目的】** アルツハイマー病（AD）の原因物質であるアミロイド β タンパク質（Aβ）には，40 残基の Aβ40 と 42 残基の Aβ42 が存在する．凝集能ならびに神経細胞毒性は Aβ40 よりも Aβ42 の方が高いが，Aβ40 の産生量は Aβ42 のおよそ 10 倍程度と圧倒的に多い．近年，Aβ の高分子凝集体（フィブリル）よりも，凝集中間体である可溶性オリゴマーが毒性本体と考えられるようになった．最近，本研究グループは，Aβ オリゴマーの最小単位である 2 量体モデルとして，毒性コンホマーを形成しやすい E22P 変異体を用いて，オリゴマー中で分子間平行 β シート形成領域にある Ala30 を L,L-2,6-ジアミノピメリン酸（DAP）で置換した E22P-Aβ40 dimer (A30DAP) (**1**)[1] を合成した．**1** は準安定な 6~8 量体を形成したが，β シート構造の割合が少なく，かつ神経細胞毒性も示さなかった．そこで本研究では，β シートの安定性向上を目的として，2 炭素増炭した L,L-2,8-ジアミノアゼライン酸（DAZ）を用いて Ala30 で架橋した E22P-Aβ40 dimer (A30DAZ) (**2**)，ならびにオリゴマー形成に不可欠な C 末端疎水性コア内（Gly38）を DAP で架橋した E22P-Aβ 40 dimer (G38DAP) (**3**) をそれぞれ合成し，構造機能解析を行った．

**【方法と結果】** Fmoc 固相法により，**2**，**3** を合成した（収率 3.1%，11.6%）．2 次構造を CD スペクトルで，凝集能をチオフラビン T 法ならびに電子顕微鏡で，神経細胞毒性を SH-SY5Y 細胞を用いた MTT 法でそれぞれ評価した．**2** および **3** の β シート含量は，**1** よりも顕著に高かったが，**2** は **1** と同様に神経細胞毒性をほとんど示さなかった．一方，**3** は架橋していない E22P-Aβ40 と比べて強い毒性を示した．溶解 48 時間後，**3** は幅 9 nm 長さ 143 nm のプロトフィブリル（50 量体以上）を形成し，さらに ion mobility-mass spectroscopy による解析から，溶解 4 時間後に 12~16 量体を形成していることが明らかになった．以上の結果より，Aβ の毒性発現には C 末端コア形成が重要であり，**3** は準安定な毒性オリゴマーモデルとして有用と考えられる．




**【文献】** 1) Murakami, K. *et al., BBRC* **2015**, *466*, 463. 2) Wetzel, R. J. *et al., J. Mol. Biol.* **2004**, *335*, 833.

Alzheimer, amyloid ß, ion mobility-mass spectrometry

発表責任者：入江一浩（irie@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4C14a12
講演日時：3 月 20 日 12:15～ C 校舎 14 会場

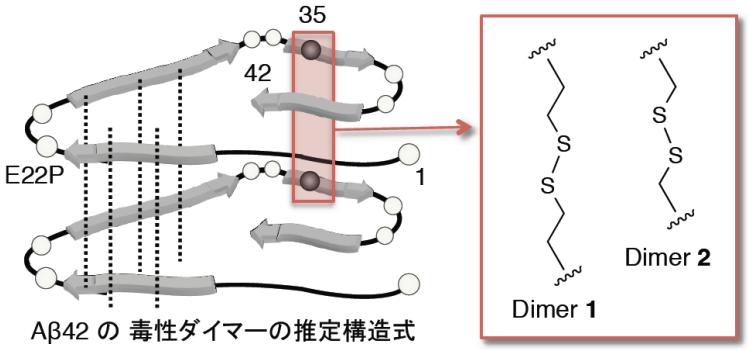
# アミロイドβ42 の 35 番目でジスルフィド架橋したダイマーの合成と活性評価

# Synthesis and characterization of the amyloid ß42 dimer models with a disulfide linker at position 35

○村上 一馬[1]、加藤 春花[1]、花木 瑞穂[1]、物部 容子[2]、赤木 謙一[2]、入江 一浩[1]（[1]京大農、[2]医薬基盤健康栄養研）
○Kazuma MURAKAMI[1], Haruka KATO[1], Mizuho HANAKI[1], Yoko MONOBE[2], Ken-ichi AKAGI[2], Kazuhiro IRIE[1] ([1]Dept. Agri., Kyoto Univ., [2]NIBIOHN)

**【背景と目的】**アルツハイマー病（AD）の原因物質であるアミロイド β（Aβ42）は，凝集（オリゴマー化：2 x *n*-mer or 3 x *n*-mer で表される 2~24 量体化）することによって神経細胞毒性を示す．これまでに，本研究グループは Aβ42 の神経細胞毒性発現機構について，金属イオンを介して生じた Tyr10 のフェノキシラジカルが，Glu22, Asp23 付近のターン形成によって，空間的に Met35 に接近した後，酸化して生成する硫黄ラジカルが細胞毒性に係わっていることを明らかにした（Murakami, K. *et al., JACS* **2005**, *127*, 15168）．近年，赤池ら（東北大）は，遊離型 Met がメチル基転移酵素によって脱メチル化されることで生成したホモシステイン（hCys）が，多硫黄化反応を受けることにより高い抗酸化活性を示すことを報告している（Ida, T. *et al. PNAS* **2014**, *111*, 7606）．脳は酸化ストレスを受けやすいことから，これらの活性硫黄分子による酸化ストレス抑制効果が期待されるが, AD 脳で活性硫黄分子が過剰産生された場合, Aβ42 の Met35 が hCys35 を経てパースルフィド化されることにより，毒性ダイマーを形成する可能性がある．本研究では，毒性配座を形成しやすい E22P-Aβ42 の Met35 を hCys および対照として Cys にそれぞれ置換し，ジスルフィド結合で架橋した E22P-M35hC-Aβ42-dimer（**1**）と E22P-M35C-Aβ42-dimer（**2**）を合成し，構造機能解析を行った．

**【方法と結果】** Fmoc 固相法でそれぞれの Aβ42 置換体を合成し，塩基性条件下での DMSO 酸化によって，ジスルフィドダイマー **1**，**2** を得た（収率 0.21%，0.66%）．凝集能をチオフラビン T 法および電子顕微鏡で調べたところ，E22P-Aβ42 はアミロイドフィブリルを形成したのに対して，**1** および **2** のチオフラビン T の蛍光値は 48 時間後も低く，球状のオリゴマーを形成した．CD スペクトルにより，**1** は溶解直後に β シートを形成すること，一方で **2** はランダム構造のままであることが判明した．ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y に対する神経細胞毒性を，MTT 法で調べた結果，**1** と **2** の細胞毒性は，E22P-Aβ42 に比べて顕著に低かった．**1** の β シート含量ならびに細胞毒性は, **2** よりも高かったことから, Cys よりも hCys によるジスルフィド架橋の方が, オリゴマー形成に適していることが示唆された. しかしながら, **1** の細胞毒性が E22P-Aβ42 よりも低かったことより，AD 病態におけるこのようなダイマー形成の寄与は高くないものと考えられる．



Aβ42 の 毒性ダイマーの推定構造式

amyloid ß, oligomer, disulfide

発表責任者：入江一浩（irie@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4C15a01
講演日時：3 月 20 日 09:20～ C 校舎 15 会場

Investigation of Thermophilic Bacteria in Volcanic Ash of Mt. Sinabung-Indonesia
○Fandi Hidayat[1,2], Ryo Fujimoto[1], Yuki Okugawa[1], Yukihiro Tashiro[1], Hasril Hasan Siregar[2], Kenji Sakai[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Indonesian Oil Palm Research Institute (IOPRI))

Recently, exploration of thermophilic bacteria is intensively conducted to enrich the diversity of microorganism. Some researchers have succeeded to isolate the thermophilic bacteria from hot springs, composting, and soil. On the other hand, information of bacterial community and thermophilic bacteria originating from volcanic ash is limited. This study aims to determine the presence of thermophilic bacteria in volcanic ash from Mt. Sinabung, North Sumatera, Indonesia.

Volcanic ash sample was taken from Mt. Sinabung eruption on July 2015 in cabbage field. The sample was enriched in CYS liquid medium at 65°C (thermophiles) and 75°C (extreme thermophiles) for 24 hours. The bacterial communities were examined using high-throughput Illumina MiSeq sequencing. Isolation of thermophilic bacteria was performed by conventional method in CYS solid medium. In addition, single cell isolation by micromanipulator technique was conducted to obtain extreme thermophile isolates. Thermophilic bacteria were identified through DNA extraction, PCR and 16S rRNA gene sequencing.

As the results of bacterial community structures, Firmicutes was the predominant phylum, accounting for 75-97% of the total effective bacterial sequences. It was indicates that thermophilic bacteria that mostly belong to Firmicutes were found in volcanic ash of Mt. Sinabung. *Geobacillus galactosidasius* and *Geobacillus caldoxylosilyticus* are the dominants thermophilic bacteria with abundance around 33.9% and 89.5%, respectively. On the other hand, *Calditerricola satsumensis* is an extreme thermophilic bacterium dominating in anaerobic and static enrichment within range 72.9-97.1%. The colony of *G. galactosidasius* was isolated from CYS solid medium with 99.47% similarity of 16S rRNA gene sequence. The isolate was characterized as Gram-Positive and has an optimum growth temperature of 50-65°C. In contrast, colonies of extreme thermophile were not obtained in CYS solid medium. However, three strains of extreme thermophilic bacteria were isolated using micromanipulator technique and will be identified.

thermophilic bacteria, Illumina Miseq sequence, 16S rRNA gene sequence

発表責任者：Kenji Sakai（kensak@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：4C15a02
講演日時：3 月 20 日 09:35～ C 校舎 15 会場

段階希釈を用いたセルロース分解微生物の集積培養
Enrichment of cellulolytic microbes by the serial dilution method
○織田 康太郎[1]、横山 和平[2]、藤井 克彦[2] ([1]山大農、[2]山大院創成)
○Kotaro ORITA[1], Kazuhira YOKOYAMA[2], Katsuhiko FUJII[2] ([1]Yamaguchi Univ., [2]Yamaguchi Univ.)

【目的】
セルロースは地球上で最も豊富なバイオマスである。これまでに多くのセルロース分解微生物が土壌等から分離されてきた。他方、セルロース分解菌を分離する際には平板培養が一般に用いられてきたが、寒天培地でコロニーを形成できない微生物も数多く存在することがわかっており、すべての分解微生物を寒天培地で分離することは難しいと考えられている。また、複数種の微生物と共同してセルロース分解を進める菌叢が存在する可能性もある。そこで本研究では、段階希釈した微生物の液体培養により新奇のセルロース分解微生物を純粋分離できるか、あるいは複数の微生物種からなるセルロース分解菌叢を得ることができるかを検討した。
【実験方法】
ブナを中心とした山口大学の演習林から、L 層（ほとんど未分解の落葉落枝）と A 層（L 層直下の腐植に富む暗色土）の試料を採集した。試料と滅菌水を 1：1（重量比）の割合で混ぜてブレンダー撹拌を行い、三重の滅菌済ガーゼでろ過し、ろ液を土壌微生物懸濁液として以降の実験に用いた。培養液として、カルボキシメチルセルロース（CMC）を溶解した脱イオン水、CMC を溶解した Yeast Nitrogen base （CMC-YNB)、CMC-YNB にさらに土壌の熱水抽出液を加えたもの（CMC-soil）の 3 種類を準備し、これらを用いて土壌微生物懸濁液を $10^{1}$～$10^{10}$ 倍まで段階希釈した。このようにして段階希釈した微生物懸濁液を 96 ウェルマイクロプレートに分注し、30℃で静置培養を行った。
【実験結果】
1 ヶ月間培養した結果、CMC-YNB および CMC-soil では希釈率の高いウェルで微生物の生育が観察された。L 層菌液については $10^{8}$～$10^{9}$ 倍希釈ウェル 96 個のうち 21 個、A 層菌液では $10^{7}$～$10^{9}$ 倍希釈ウェル 144 個のうち 63 個で生育が見られ、これらを新鮮培養液でさらに継代培養した。次に、菌液から DNA を抽出し、PCR-DGGE で菌叢解析した。実験の結果、1 種類の微生物種に集積されているものはなく、全ての菌液が複数種の細菌と糸状菌で構成されていた。また、同じ土壌に由来する試料を集積培養したにもかかわらず、菌叢構成メンバーに差異が見られるウェルもあった。L 層と A 層の両菌液を比較したところ、A 層で多様性が特に高い傾向にあった。従って、単一微生物種として純粋分離することにこだわらないのであれば、段階希釈した試料をマイクロプレートで培養する方法はひとつの試料から複数のセルロース分解微生物（群）を得ようとする目的に利用できると考えられた。

cellulolytic microbes, serial dilution, microbial flora

発表責任者：藤井克彦（kfujii@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：4C15a03
講演日時：3 月 20 日 09:50～ C 校舎 15 会場

# Genomic characterization of a new methylotroph, Oharaeibacter diazotrophicus SM30

○HAOXIN LYU, AKIO TANI (IPSR, Okayama Univ.)

**Objective**

Plants emit methane (63-243 Tg per year) and methanol (about 100 Tg per year) from their leaves and provide methylotrophs with habitats. Recently lanthanide metals are found to be important and essential cofactor for XoxF type methanol dehydrogenase (MDH) (Nakagawa et al.), which is conserved in all gram-negative methylotrophic bacteria. In this work we used lanthanides to isolate novel methylotrophic bacteria from rice rhizosphere. We found a strain belonging to a new genus, whose growth on methanol is enhanced by lanthanide metals. The strain has been proposed as a new genus, *Oharaeibacter diazotrophicus,* which is phylogenetically close to *Pleomorphomonas* species (Lv et al.). In order to explore methylotrophy-related genes harbored in the strain, genome sequencing was done in this study.

**Methods and Results**

Genomic DNA of *O. diazotrophicus* strain SM30, isolated from rice rhizosphere of experimental field in IPSR Okayama University, was subjected to genome-sequencing with PacBio sequencer. The complete genome size was 5,004,097 bp, with one circular chromosome (4,841,392 bp) and two circular plasmids (pSM30-1, 141,326 bp and pSM30-2, 21,379 bp). The genome contains five PQQ-dependent MDH-like genes and named as *mxaF*, *xoxF1*, *xoxF2*, *xoxF3* and *xoxF4*. To investigate the expression of these genes in SM30, cell free extracts from the cells grown on methanol in the presence of calcium (Ca) or lanthanum (La) were subjected to SDS-PAGE analysis. The major protein bands of ca. 60 kDa were identified by MALDI-TOF/MS. Strain SM30 showed expression of XoxF in the presence of La, and MxaF in the absence of La, suggesting that strain SM30 also has similar lanthanide-dependent switching system for MDHs in *Methylobacterium* species. The interaction among these five MDHs with each other is still unclear. Besides, genes involved in methylamine dehydrogenation, $H_4F$ pathway and serine cycle were also found in SM30 genome, suggesting that SM30 has similar methylotrophy system to that of *Methylobacterium* species. As a new genus, SM30 may encompass some other interesting genes.

**References**

Nakagawa, T., Mitsui, R., Tani, A., Sasa, K., Tashiro, S., Iwama, T., Hayakawa, T. & Kawai, K. 2012. A catalytic role of XoxF1 as $La^{3+}$-dependent methanol dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* strain AM1. PLoS One 7 (11): e50480.

Lv, H., Masuda, S., Fujitani, Y., Sahin, N. & Tani, A. 2016. *Oharaeibacter diazotrophicus* gen. nov., sp. nov., a diazotrophic and facultatively methylotrophic bacterium, isolated from rice rhizosphere. IJSEM in press.

methanol, methylotroph, lanthanides

発表責任者：Akio Tani（atani@okayama-u.ac.jp）

講演番号：4C15a04
講演日時：3 月 20 日 10:05～ C 校舎 15 会場

乳幼児から分離された *Bifidobacterium bifidum* TMC3115 株のゲノム解析とその特性
Characteristic genome of *Bifidobacterium bifidum* TMC3115 isolated from infant faeces
○原田 岳[1]、依田 一豊[1]、宮澤 賢司[1]、山崎 和幸[1]、平松 優[1]、何 方[1]、遠藤 明仁[2]([1]タカナシ乳業（株）商品研究所、[2]東農業大生産)
○ Gaku HARATA[1], Kazutoyo YODA[1], Kenji MIYAZAWA[1], Kazuyuki YAMAZAKI[1], Masaru HIRAMATSU[1], He FANG[1], Akihito ENDO[2] ([1]Takanashi Milk Products, [2]Tokyo University of Agriculture)

【背景・目的】
乳幼児から分離されたビフィズス菌の中で *Bifidobacterium bifidum* TMC3115 株（TMC3115 株）は、他のビフィズス菌株と比較して①腸管上皮細胞株 Caco-2 細胞及びヒト腸管粘液への付着性が強く、②マウスマクロファージ細胞様株 J774.1 から産生される抗炎症性サイトカイン IL-10 を高産生し、③アレルギーの引き金となるマスト細胞（ラット好塩基球性白血病マスト細胞）からの脱顆粒応答の抑制が強いことが、細胞レベルで確認されている。本研究では TMC3115 株のゲノムと他の *B. bifidum* 菌株のゲノムを比較することで、これらのメカニズムの一端を解明することを目的とした。
【方法と結果】
TMC3115 株について PacBioRSⅡを用いて全ゲノムシークエンスを実施した結果、ゲノムサイズは 2,178,894 bp、GC%は 62.78%の完全長配列が構築され、プラスミドは検出されなかった。得られたゲノム配列を MiGAP によりアノテーションを行ったところ、1796 個の CDS が見出された。この TMC3115 株のゲノムを、既にゲノム情報が公開されている 22 株の *B. bifidum* のゲノムと比較したところ、115 個の CDS が TMC3115 株に特異的な遺伝子であった。近年、腸管への強い付着性や免疫賦活作用には線毛が深く関わっていることが報告されており、他の *B. bifidum* 菌株で報告されている線毛遺伝子クラスター（*pil*1、*pil*2、*pil*3）が TMC3115 株に存在するか解析を行った。その結果、TMC3115 株には 3 つの線毛クラスターが存在するが、他菌株と比較して *pil*2 クラスター内の FimA 遺伝子配列に 3 箇所合計 10 塩基のギャップが存在することがわかった。現在、再度発現の有無を確認している。その他、ムチン代謝に関わる遺伝子や細胞壁タイコ酸やリポタイコ酸の生合成経路に関わる遺伝子が存在し、これらの表層構造物がマクロファージやマスト細胞といった宿主細胞が有する微生物センサーにより認識されると考えられる。

bifidobacteria, genome, adhesion

発表責任者：原田岳（g-harata@takanashi-milk.co.jp）

講演番号：4C15a05
講演日時：3 月 20 日 10:20～ C 校舎 15 会場

新奇セルロース分解海洋細菌 *Gilvimarinus japonicus* の特性と海藻分解能の研究
Isolation and characterization of *Gilvimarinus japonicus* sp. nov.
○江水 秀之[1]、時川 鴻希[2]、里見 正隆[3]、島袋 勝弥[4]、藤井 克彦[5] ([1]山大院農、[2]山大農、[3]中央水研、[4]宇部高専・物質工学、[5]山大院創成)
○Hideyuki KOHZUI[1], Kohki TOKIKAWA[2], Masataka SATOMI[3], Katsuya SHIMABUKURO[4], Katsuhiko FUJII[5] ([1]Yamaguchi Univ., [2]Yamaguchi Univ., [3]NRIFS., [4]Ube kosen., [5]Yamaguchi Univ.)

【目的】
セルロースは地球上で最も豊富なバイオマスであり、多くのセルロース分解微生物がこれまでに陸上（土壌等）から分離されてきた。他方、海洋に棲息するセルロース分解微生物については、陸上のそれと比較して分離例および研究例が少ない。そこで本研究ではセルロース分解能を持つ新奇の海洋微生物を単離することを試み、得られた単離株の系統解析、海藻分解能、そして海藻分解液の利用可能性を検討した。
【実験方法】
人工海水に窒素源（$NH_4Cl$、$KNO_3$）、リン源（グリセロールリン酸）を加えた補強海水を調製し、これにろ紙を唯一の炭素源として加えたものを培養液として用いた。山口県の瀬戸内海および日本海沿岸から枯死海藻片や浮遊ゴミ片を採集し、これらを滅菌人工海水に懸濁したものを微生物源とした。微生物源サンプルを培養液に加え、145rpm、23℃で 4 週間集積培養した。微生物の生育が確認されたものについては、補強海水にろ紙の代わりに carboxymethylcellulose(CMC)を加えた寒天培地を調製し、これに菌液を画線し、23℃、3 日間で培養した。寒天培地上に出現したコロニーをを単離し、12-2 株と名付けた。
【結果】
12-2 株の 16s-rRNA 遺伝子の配列を決定して相同性検索をしたところ、*Gilvimarinus* 属に属する株であることがわかった。しかし同属既知種との相同性は 97.9%であり、既知種とは別である可能性が示唆された。そこで既知種との DNA 交雑実験を行ったところ、交雑率は 70%を下回り、同属新種であることが示された。炭素源資化性能、生育温度域、耐塩性、抗生物質感受性を含む生理学・生化学試験でも既知種とは異なる性質が見出された。そこで、12-2 株を *Gilvimarinus japonicus* と命名し、新種提案を行った。
他方、12-2 株はエンドセルラーゼ活性は有しているものの、エキソセルラーゼ（セロビオハイドロラーゼ）活性は検出されなかった。また、アガラーゼ活性を持っていることもわかった。どのような種類の海藻（緑藻、褐藻、紅藻）に対して分解能を持つかを検討したところ、緑藻と紅藻に対して分解能を持っていたが、褐藻に対する分解能はなかった。さらに耐塩性酵母と嫌気消化液を用いてエタノールあるいはバイオガスを生産できるかも試験した。

marine microorganism, seaweed, cellulolytic bacteria

発表責任者：藤井克彦（kfujii@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：4C15a06
講演日時：3 月 20 日 10:35～ C 校舎 15 会場

# MALDI-TOF MS を用いた担子菌類同定における菌糸増殖期が及ぼすタンパク質の変化

# Changes in protein caused by mycelial growth phase in basidiomycetes identification using MALDI-TOF MS

○岩本 孝樹、浜田 亮祐、堀沢 栄 (高知工科大学)
○Kouki Iwamoto, Ryousuke Hamada, Sakae Horisawa (Kochi University of Technology)

担子菌類の正確な同定は、微生物利用、医療関係、衛生管理、農業分野などの様々な分野で必要とされている。現在は、DNA を用いる同定方法が発達し、検出感度も信頼性も高いために頻用されている。しかし、クローニングには手間がかかり、大量に分析するにはコストが高くなる。そこで、細胞中のタンパク質の情報に基づく同定方法が注目されている。これは、MALDI-TOF MS を用いて、細胞内の 2000～20000Da の比較的小さなペプチド全てを合わせたスペクトルを取得し、既知の菌種のスペクトルと比較することで種の同定またはタイピングを行う。既にバクテリア、酵母類ではスペクトルのデータベースが作成されており、実用段階の研究が進められている。しかし、糸状菌類ではまた報告が少ない。そこで本研究では、担子菌類の種の同定およびタイピングについて検討することとした。これまで種の判定について検討したところ、同定が可能な担子菌類もあったが、MS スペクトルの再現性が低いため判定が困難である種も見られた。そこで取得した MS スペクトルの再現性を高めるために供試菌を採取に最適な成長ステージを検討した。また、抽出したタンパク質の濃度が MS スペクトルに依存するのか検討した。

木材腐朽菌を中心とした担子菌類を用い、各供試菌をポテトデキストロース寒天培地上の定常期のコロニーよりタンパク質を抽出した。Autoflex Speed (Burker)を用いて MS スペクトルを取得し、MALDI Biotyper（Burker）を用いてデータベースを作成した。種間および種内のスペクトルパターンを比較したところ、細胞内に生産されたペプチドすべてについてのスペクトルパターンは、菌種または菌株に特徴的であった。これにより、糸状菌類である担子菌類でも種や種内の同定ができる可能性が示された。しかし、ヤケイロタケ *Bjerkandera adusta* は菌糸増殖期によって気相菌糸や基中菌糸を形成する株が存在し、菌糸の増殖期によって採取する菌糸に違いが MS スペクトルに影響していた。試料菌糸の成長ステージを一致させることで同定精度を上げられることがわかった。従って、様々な成長ステージの MS スペクトルをデータベースに登録しておくことで異なる成長ステージに対応することができ、同定精度を上げられると考えられる。ヒラタケ *Pleurotus ostreatus* とその近縁種ウスヒラタケ *P. pulmonarius* を用いて試料濃度を検討では、抽出したタンパク質濃度を順次希釈するにつれて MS スペクトルのピーク強度が減少し、得られるピーク数も少なくなったこ。従って、抽出したタンパク質の濃度は MS スペクトルに影響することが示された。安定したピークパターンを得るには塗布する試料が 10ng 以上必要であることが明らかとなった。

maldi-tof ms, species identification, fungi

講演番号：4C15a07
講演日時：3 月 20 日 11:00～ C 校舎 15 会場

# イオン交換樹脂と細菌における伝導率の関係

# Relation of Conductivity in Ion-exchange resin and Bacteria

○丸山 聖羅[1]、渡邊 彬宏[1]、小林 徹[2]、三浦 健[1] ([1]東洋大学、[2]海洋研究開発機構)
○Seira MARUYAMA[1], Akihiro WATANABE[1], Tohru KOBAYASHI[2], Takeshi MIURA[1] ([1]Toyo Univ., [2]JAMSTEC)

これまでに、深海海底サンプルを前処理条件の違いにより明らかに異なる観察された。その原因として、微生物と土壌粒子間に異なる電荷が生じ、両者が結合していたことが示唆された。そのため、イオン強度の違いによって両者を分離できるのではないかと推測した。そこで、イオン強度を変化させる新規スクリーニング法を構築し、塩分濃度を変化させることで、微生物の取得を試みた。

まず、土壌粒子をイオン交換樹脂として仮定して、カラムにイオン交換樹脂を充填した。菌株を 100 mM Tris-HCl Buffer（pH7）1 ml に懸濁、希釈したものを重層した。これを一度 100 mM Tris-HCl Buffer（pH7）で洗浄し、NaCl 濃度を 6 M まで段階的に上昇させ分取した。この分取液を生育寒天培地に塗布し、培養後にコロニー数の観察を行なった。また、その分取液の伝導率も測定した。まず、グラム陰性菌である *Escherichia coli* NBRC3972 において、陰イオン・陽イオン交換樹脂どちらにおいてもイオン交換樹脂に菌株が結合せず、NaCl 濃度を上昇させる前の分取液からコロニーが観察された。また、グラム陰性菌の *Acetobacter aceti* NBRC14818 を用いて行なった結果、同じような結果が得られた。このことから、グラム陰性菌は帯電していないか、負に帯電していることが示唆された。一方、グラム陽性菌においては、まず *Bacillus subtilis* NBRC3134 を用いて行なった。その結果、陽イオン交換樹脂では、NaCl 濃度を上昇させる前からイオン交換樹脂に菌株が結合せず、多くの分取液からコロニーが観察された。しかし、陰イオン交換樹脂のみ、NaCl 濃度を上昇させる前に菌株が全て陰イオン交換樹脂結合し、NaCl 濃度を上昇させ伝導率が 1.79 S/m の時に、菌株が陰イオン交換樹脂から外れることが確認された。そこで、他のグラム陽性菌を用いて同様の実験を行なった。例えば、*Streptococcus aureus* NBRC12732 や *Enterococcus faecalis* NBRC100480 などを用いた。その結果、NaCl 濃度を上昇させる前に菌株が全て陰イオン交換樹脂結合していたが、菌株間での陰イオン交換樹脂から外れる伝導率が異なった。*S.aureus* NBRC12732 では 2.4～2.6 S/m、*E.faecalis* NBRC100480 では 2.6～3.4 S/m の間において、伝導率でコロニーが陰イオン交換樹脂から外れた。これらの結果から、微生物と土壌粒子との間で異なる電荷が生じており、ペプチドグリカン層のアミノ酸組成、菌株の形状、運動性の有無から、このような差が出るのではないかと示唆された。

conductivity, ion-exchange resin, new screenig method

講演番号：4C15a08
講演日時：3 月 20 日 11:15～ C 校舎 15 会場

フルクトフィリック乳酸菌 *Fructobacillus fructosus* NRIC 1058$^T$ の生育特性における *adhE* 遺伝子の影響

Impact of *adhE* gene on growth characteristic of fructophilic lactic acid bacterium, *Fructobacillus fructosus* NRIC 1058$^T$

○前野 慎太朗[1]、梶川 揚申[2]、中川 純一[1]、遠藤 明仁[1] ([1]東農大生物産業、[2]東農大応用生物科学)
○SHINTARO MAENO[1], AKINOBU KAJIKAWA[2], JYUNICHI NAKAGAWA[1], AKIHITO ENDO[1] ([1]Faculty of Bioindustry, Tokyo University of Agriculture, [2]Faculty of Applied Biology and Chemistry, Tokyo University of Agriculture)

【背景】

フルクトフィリック乳酸菌（FLAB）は、グルコースを唯一の炭素源とする培地で通常の培養を行うとほとんど生育しないが、フルクトースを糖源とした培養や電子受容体存在下では良好な生育を見せるという特徴を示す。FLAB の代表菌群である *Fructobacillus* 属はその近縁属である *Leuconostoc* 属と比較してゲノムサイズが小さく、遺伝子数が少ないことが分かっており、糖代謝に関連する遺伝子を特に欠損させていることが明らかとなっている。グルコース代謝において、一般的なヘテロ発酵乳酸菌では acetaldehyde dehydrogenase と alcohol dehydrogenase 活性を持つ二機能性酵素 AdhE をコードしている *adhE* 遺伝子がエタノール生産に深く関与している。一方で、我々のこれまでの研究により、*Fructobacillus* 属は *adhE* を欠損しており、そのために *Fructobacillus* 属はグルコースを代謝できないのではないかと考えられている。そこで本研究では、*F. fructosus* に *adhE* を導入することで、*adhE* が *F. fructosus* に与える影響を明らかにすることを目的とした。

【実験方法・結果・考察】

本研究では FLAB の代表菌種である *Fructobacillus fructosus* NRIC 1058$^T$ 株をホストとし、近縁種である *Leuconostoc mesenteroides* NRIC 1541$^T$ 株を *adhE* 供与体として用いた。また、AdhE は大腸菌に対して毒性を示すという報告があることから、*adhE* クローニングのためのベクターとして、プロモーターレスの pSJE を用いた。まず、*L. mesenteroides* 由来の *adhE* を PCR で増幅し、大腸菌内でクローニングを行い、そのプラスミドの *adhE* 遺伝子上流に *Lactobacillus brevis* の *slpA* 由来のプロモーターを挿入した。このプラスミドを *F. fructosus* に導入し、目的とする形質転換体を得た。そこで、得られた形質転換体の表現性状を観察した。グルコースを炭素源とする培地では親株はほとんど生育しないものの、形質転換体は一般的なヘテロ発酵乳酸菌と同程度の生育が確認された。次に、グルコース代謝からの最終生産物を測定した。FLAB である親株は乳酸と酢酸を主に生産したのに対し、形質転換体は一般的なヘテロ発酵乳酸菌と同様に乳酸とエタノールを主に生産し、酢酸生産量は乳酸に比べて著しく少なかった。これらの結果より、*F. fructosus* が有しているフルクフィリックな特徴は *adhE* の欠損によるものであり、グルコース代謝時に NADH の酸化が十分でないために、グルコースで生育することが出来ず、電子受容体は NADH の酸化を助けることが明らかとなった。

lactic acid bacteria, metabolism, genomics

発表責任者：遠藤明仁（a3endou@bioindustry.nodai.ac.jp）

講演番号：4C15a09
講演日時：3 月 20 日 11:30～ C 校舎 15 会場

# 無機的環境下における真菌類の単体硫黄の酸化

# Oxidation of elemental sulfur of fungi in inorganic environment

○佃 眞緒[1]、大岩 祐児[1]、北原 直樹[1]、高原 勇[1]、佐藤 勉[2]、片山 葉子[1] ([1]東京農工大院農、[2]株式会社秋田今野商店)
○Mao TSUKUDA[1], Yuji OIWA[1], Naoki KITAHARA[1], Yu TAKAHARA[1], Tsutomu SATOU[2], Youko KATAYAMA[1] ([1]Tokyo Univ.of Agriculture and Tech., [2]Akita Konno Co.,Ltd)

【背景】

石造建造物の劣化原因の一つに、微生物の代謝産物によるものが挙げられる。特に、硫黄酸化細菌のような無機硫黄化合物を酸化し、生育のための化学エネルギーを得る微生物は、代謝産物として硫酸を生じ、これが石材の劣化を引き起こす。本研究室では日本国政府アンコール遺跡救済チームの作業の一環として、アンコール遺跡の微生物劣化についての調査を行ってきた。この調査により、細菌に加え *Fusarium solani*THIF01 株を含む 19 株の真菌にも、独立栄養条件下において硫黄酸化活性を示すものが得られた(Li et al,2009)。通常、真菌は有機物を資化する従属栄養性と考えられているが、これらの真菌は単体硫黄を酸化することでもエネルギーを得て、独立栄養的生育をすると考えられる。このような性質は遺跡から分離された真菌株だけの特徴ではなく、真菌に広くみられる性質であると考えられる。そこで、菌株保存機関から分譲された真菌株を用いて硫黄酸化活性を検証した。

【方法・結果】

菌株保存機関から分譲された 18 菌株を供試した。単体硫黄を含む無機塩寒天培地の中心に菌を接種し、単体硫黄が可溶性の硫酸へ酸化された時に見られるクリアゾーンの形成を観察した。その結果、16 菌株に活性が見られ、クリアゾーンの大きさは直径 1cm 以上のものが 6 菌株、0.2～1cm のものが 10 菌株であった。これらのうち *Fusarium solani* f.sp. *pisi* NBRC9425、*Aspergillus oryzae* AOK 12-2、*Trichoderma viride* AOK A1606 を選び、硫黄を含んだ無機塩液体培地を用いて、硫酸イオンの生成量を経時的に計測した。その結果、無機塩液体培地中での硫黄酸化活性は 3 菌株の中では *F. solani* NBRC9425 株が最も硫酸イオンの生成量が高かった。この培養系に 0～10 mg/L グルコースを添加し、菌株の単体硫黄の酸化に有機物が及ぼす影響を硫酸イオンの生成速度の違いから検討した。その結果、グルコース添加濃度が 1.0 mg/L および 10 mg/L では硫酸イオンの生成がよく見られたが、0.01 mg/L および 0.1 mg/L ではその約 3 分の 1 から 5 分の 1 程度の生成であり、0 mg/L では生成が見られなかった。このことは、0.01 mg/L および 0.1 mg/L のグルコースに相当する有機物が硫酸イオンを生成するには必要であることを示し、クリアゾーン形成実験における結果は、寒天培地中に混在する微量の有機物が関与したと考えられる。以上の結果、遺跡からの分離株に限らず保存菌株においても硫黄酸化能が存在することが確認された。

fungi, *Fusarium solani*, sulfur oxidation

講演番号：4C15a10
講演日時：3 月 20 日 11:45～ C 校舎 15 会場

# The mechanism of curcumin-degradation by microorganisms

○Shuai Shao, Tairo Hagishita, Yoshifumi Shinoda, Sakayu Shimizu (Dept. microbio., Kyoto gakuen Univ.)

Curcumin is the principal curcruminoid of turmeric (*Curcuma loga*). As a kind of natural polyphenol, it has antioxidative and anticarcinogenic activities. But curcumin has a low absorption rate in human body. In order to improve bioavailability of curcumin and search the analogs or products of curcumin which have high water-solubility or absorption, the curcumin-degradation microorganisms were found by using microbiology screening. Liquid medium containing the low concentration 0.001% curcumin as carbon source was used for microbiological screening. Several curcumin-degradation stains were isolated. Then the isolated microorganism cells which were amassed by liquid culture 2 days at 30℃ were added to react with curcumin. 2 strains were characterized. The 54-3Y strain converted the curcumin into tetrahydrocurcumin within 3 hour which has reported. From the analyses result of decomposition products by LC-MS, when the other isolated strain 87-4 was reacted with curcumin, the new reaction products were determined by LC-MS. The molecular weight of one of the products was 192. And this component was being analyzed.

curcumin, curcuminoid, degradation

講演番号：4C17a02
講演日時：3 月 20 日 09:35～ C 校舎 17 会場

バイオマス由来発酵阻害物質ストレス下における *ADH7* の優先的翻訳とその応用
Preferential expression of yeast *ADH7* in the presence of vanillin, furfural and HMF.
○石田 陽子、Nguyen Trinh、井澤 真吾（京工繊大応生）
○Yoko ISHIDA, Trinh Nguyen, Shingo IZAWA (Kyoto Inst. Technol.)

【目的】廃材や稲藁などをはじめとするリグノセルロース系バイオマスから生産される第二世代バイオエタノールは、食糧資源と競合しないことや未利用資源の有効活用という点で、今後の規模拡大が期待される再生可能エネルギーである。しかし、バイオマスの糖化前処理の過程でバニリンやフルフラール、5-hydroxymethyl furfural (HMF)などの発酵阻害物質が副産物として生じてしまい、酵母の生育や発酵能を著しく抑制・阻害することが問題となっている。我々はこれまでに、高濃度の発酵阻害物質はそれぞれ単独で酵母の翻訳を抑制すること(Iwaki *et al*., 2013)、バニリンによる翻訳抑制下でも *ADH7* や *BDH2* の mRNA は優先的に翻訳され発現することを報告している。しかし実際のバイオマス加水分解物中には、バニリン・フルフラール・HMF が混在していることから、三つの発酵阻害物質からなる複合ストレス(VFH ストレス)下における翻訳活性や *ADH7* と *BDH2* の遺伝子発現などについて検討を行った。
【結果と考察】ポリソーム解析の結果、バニリン、フルフラール、HMF がそれぞれ 7 mM ずつ存在する条件下(7 mM VFH ストレス下)では酵母の翻訳活性が著しく抑制されることが明らかとなった。VHF ストレス下における *ADH7* と *BDH2* の発現を検討したところ、両遺伝子ともに mRNA レベルの増加が確認された。しかし、7-10 mM VFH ストレス下で Adh7 タンパク質の合成が顕著に誘導されたのに対し、Bdh2 タンパク質の合成はほとんど認められなかった。また、7 mM VFH ストレス下での *adh7*Δ株の生育は野生株や *bdh2*Δ株よりも有意に遅かった。これらの結果から、VFH ストレスに対する耐性獲得において *ADH7* の発現誘導が重要だと考えられた。また、*ADH7* プロモーターを用いて *ALD6* の発現を誘導したところ、野生株の VFH ストレス耐性が改善した。そのため、*ADH7* の優先的翻訳機構の利用がバイオエタノール製造効率の改良に役立つことが示唆された。
【参考文献】Ishida *et al*. (2016) *Front. Microbiol*., **7**, 1059; Nguyen *et al*. (2015) *Front. Microbiol*., **6**, 1390; Iwaki *et al*. (2013) *Appl. Environ. Microbiol.*, **79**, 1661-1667; Iwaki *et al*. (2013) *PLoS One*, **8**, e61748.

vanillin, furfural, preferential translation

発表責任者：井澤真吾（thioredoxin@kit.ac.jp）

講演番号：4C17a03
講演日時：3 月 20 日 09:50～ C 校舎 17 会場

# 酢酸ストレスによる酵母小胞体ストレス応答の誘導
# Induction of UPR by acetic acid stress in yeast cells

○河添 希美[1]、木俣 行雄[2]、井澤 真吾[1] ([1]京工繊大　応生、[2]奈良先端科技院大　バイオ)
○Nozomi KAWAZOE[1], Yukio KIMATA[2], Shingo IZAWA[1] ([1]Kyoto Inst. Tech., [2]NAIST)

【目的】真核細胞では、ミスフォールディングしたタンパク質が小胞体内に蓄積すると小胞体ストレス応答（Unfolded Protein Response: UPR）を誘起することが知られている。酵母では、高濃度エタノールストレスや亜鉛欠乏によってUPRが誘導されることが報告されている(Nguyen *et al*., 2013; Miyagawa *et al*., 2014)。一方、木質・草本系バイオマスの糖化前処理や酢酸菌の混入などで生じる酢酸は、酵母の生育と発酵能を抑制する発酵阻害物質であり、バイオエタノールの効率的な製造において大きな障壁となっている。そのため、酵母の酢酸耐性の向上やその基盤となる分子機構の解明などが強く求められているが、酵母の酢酸応答機構は未だ十分に解明されていない。古くから酢はタンパク質の変性を引き起こすことが知られていることから、本研究では酢酸が酵母のUPRを誘導するのか検討した。
【結果と考察】主要な小胞体シャペロンであるBiPは小胞体内でミスフォールディングしたタンパク質に結合して凝集体を形成するが、酢酸処理 (>0.2% v/v)によって不溶性画分におけるBiPレベルの上昇が確認された。また、小胞体ストレスセンサーであるIre1の細胞内局在についても、酢酸存在下での局在変化が観察されたことから、酢酸ストレスによってミスフォールディングしたタンパク質が小胞体中で増加したことが示唆された。さらに、活性型のIre1によって*HAC1* mRNAがスプライシングされ、*KAR2*などのUPRに関連するHac1標的遺伝子の転写活性化が酢酸ストレスによって誘導された。これらの結果から、酢酸ストレスによって小胞体内でタンパク質のミスフォールディングが惹起され、Ire1-Hac1 pathwayの活性化が誘導されたと考えられた。また、0.1% 酢酸や5% エタノールはそれぞれ単独ではIre1の局在変化を誘導しなかったが、両者が共存する複合ストレス下ではIre1の活性化が確認された。そのため、エタノールを始めとする様々なストレスが共存するバイオマスの発酵タンク中では、低濃度の酢酸であっても小胞体ストレスやUPRを引き起こす可能性が高いと考えられた。

【参考文献】Nguyen *et al.* (2013) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**:1337-1339; Miyagawa *et al*. (2014) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **78**:1389-1391.

Acetic acid stress, Bioethanol, Unfolded Protein Response

発表責任者：井澤真吾（thioredoxin@kit.ac.jp）

講演番号：4C17a04
講演日時：3 月 20 日 10:05～ C 校舎 17 会場

# 大気圧低温プラズマによる真菌殺菌機構に関する研究：protein quality control に及ぼす影響の解析

# Effects of cold atmospheric pressure plasma on the protein quality control in yeast cells

○糸岡 洸樹[1]、木俣 行雄[2]、井澤 真吾[1] ([1]京工繊大応生、[2]奈良先端科技院大バイオ)
○Koki ITOOKA[1], Yukio KIMATA[2], Shingo IZAWA[1] ([1]Kyoto Inst. Technol., [2]NAIST)

【目的】新しい殺菌方法として大気圧低温プラズマ(Cold Atmospheric pressure Plasma: CAP)が注目を集めているが、酵母などの真核微生物に対する作用機構についての知見は少ない。これまでに我々は、CAP 照射に伴い出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)の細胞内で酸化的ストレスや翻訳抑制だけでなく、小胞体ストレスセンサーである Ire1 の局在変化が誘導されることを見出している(Itooka *et al*., 2016)。小胞体ストレス応答（Unfolded Protein Response : UPR）は真核生物特有のものであり、CAP に対する真核生物の応答を知るうえで重要だと考えられた。そこで、小胞体内を含む酵母細胞内のタンパク質に及ぼす CAP 照射の影響を検討した。

【結果と考察】小胞体内のミスフォールディングしたタンパク質レベルを検討した結果、CAP 処理によってその増加が確認された。また、小胞体ストレスセンサーである Ire1 の局在を検討したところ、CAP 処理によって Ire1-GFP の細胞内局在が速やかに変化し、Ire1 の活性化が示唆された。そこで、Ire1-Hac1 pathway の活性化を検討したが、*HAC1* mRNA のスプライシングや Hac1 標的遺伝子の転写活性化は CAP 処理によって誘導されなかった。そのため、本研究の CAP 照射条件下では小胞体ストレスは惹起されるものの、UPR の誘導には至らずに細胞死に至っていると考えられた。また、細胞質側でのタンパク質の変性を Hsp104 および peroxiredoxin Tsa1 の局在を指標に検討したところ、いずれの因子も CAP 処理によって細胞質に明瞭な foci を形成し、タンパク質の変性および凝集が生じることが確認された。また、Tsa1 が凝集したことから、これらのタンパク質の変性は過酸化水素を介したものだと考えられた(Hanzén *et al*., 2016)。以上の結果から、CAP 処理によって酵母細胞の小胞体内や細胞質でタンパク質の変性が引き起こされていることが強く示唆された。現在、タンパク質のユビキチン化に対する影響についても検討している。

【参考文献】 Itooka *et al*. (2016) *Appl. Microbiol. Biotechnol*., **100**, 9295-9304; Hanzén *et al*. (2016) *Cell*, **166**, 140-154.

Cold Atmospheric pressure Plasma, Plasma, Unfolded Protein Response

発表責任者：井澤真吾（thioredoxin@kit.ac.jp）

講演番号：4C17a05
講演日時：3 月 20 日 10:20～ C 校舎 17 会場

# 酵母メタノール誘導性遺伝子発現のシグナル伝達経路の解析

# Analysis of signal transduction pathway of methanol-inducible gene expression in yeast

○大澤 晋、阪井 康能、由里本 博也（京大農）
○Shin OHSAWA, Yasuyoshi SAKAI, Hiroya YURIMOTO (Kyoto Univ.)

【目的】メタノール資化性酵母はメタノールによって特異的かつ強力に誘導されるプロモーターを有しており、そのメタノール誘導性遺伝子発現は、異種タンパク質生産のために広く利用されている。メタノール誘導性遺伝子発現に関与する転写制御因子については多くの研究が進められているが、そのシグナル伝達に関するメタノールセンシング分子やそのメカニズムについては全く知られていなかった。我々は、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においてストレスセンサーとして知られる Wsc ファミリータンパク質のメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* におけるホモログ(PpWsc1, PpWsc3)がメタノール誘導性遺伝子発現に関連することを明らかにしている。*S. cerevisiae* において Wsc ファミリータンパク質が細胞表層のストレスセンサーとして働く場合、cell wall integrity (CWI) pathway が働くことが知られている。我々は、これまでに、CWI pathway 構成因子である small GTPase Rho1 (PpRho1) の活性型がメタノール誘導性遺伝子発現を負に制御することを明らかにしている(1)。本研究では、PpRho1 以降のシグナル伝達経路とメタノール誘導性遺伝子発現との関連、メタノール存在下における PpRho1 の活性化レベルについて解析をおこなった。
【方法・結果】まず、PpRho1 の下流のシグナル伝達因子である PpPkc1 について解析を行った。*P. pastoris* において PpPkc1 の活性型変異体を発現させると、メタノール誘導性遺伝子発現量が著しく低下した。一方、PpPkc1 の下流のシグナル伝達因子である PpMkk1 の活性型変異体を発現させた時、メタノール誘導性遺伝子発現への影響は見られなかった。これらのことから、PpMkk1 非依存的な経路で PpPkc1 はメタノール誘導性遺伝子発現を制御することが示唆された。次に、メタノール存在下における PpRho1 の活性化レベルについて解析を行った。活性型 Rho1 は Pkc1 と特異的に結合する。この相互作用を利用した Pulldown assay により、活性型 PpRho1 のレベルが、メタノール濃度に応じて PpWsc１依存的に変動することが分かった。以上の結果から、PpRho1 の活性は PpWsc1 依存的に制御され、メタノール誘導性遺伝子発現を調節していることが示された。

(1) 大澤ら 日本農芸化学会 2016 年度大会 2F094

methylotrophic yeast, Cell wall integrity pathway, Protein kinase C

講演番号：4C17a06
講演日時：3 月 20 日 10:35～ C 校舎 17 会場

酵母 Hog1 の細胞内隔離は熱耐性を向上させる
Intracellular sequestration of yeast Hog1 is involved in heat tolerance
○白石 晃將[1,2]、日置 貴大[1]、由里本 博也[1]、阪井 康能[1] ([1]京大院農、[2]日本学術振興会特別研究員)
○KOSUKE SHIRAISHI[1,2], TAKAHIRO HIOKI[1], HIROYA YURIMOTO[1], YASUYOSHI SAKAI[1]
([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]JSPS Research Fellow)

Hog1 は代表的なストレス応答因子で、浸透圧ストレス時、核へ移行し下流のタンパク質をリン酸化するキナーゼとして働くことで、ストレス応答遺伝子発現に寄与している。近年、Hog1 の高温ストレス、酸化ストレスなど様々なストレスへの寄与が報告されているが、Hog1 の核移行以外の細胞内動態に関する知見はない。我々はメタノール資化性酵母 *Candida boidinii* に加え、異なる他 3 属の酵母（出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris*、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe*）を用いて、高温ストレス、浸透圧ストレスにおける Hog1-GFP/Venus/YFP の細胞内局在を調べたところ、高温ストレス条件下、*S. cerevisiae* を除く 3 属の酵母において蛍光タンパクが細胞質にドット状の局在を示すこと、このドットがストレスにより形成が誘導されるストレス顆粒と部分的に共局在すること、さらにストレス顆粒との共局在には Hog1 の N 末端領域が必要かつ十分であることを明らかにしている[1)]。しかし Hog1 のストレス顆粒への局在に関する生理的意義に関しては不明であった。

Hog1 のストレス顆粒への局在が細胞生育に与える影響を調べるため、高温ストレス条件下において、ストレス顆粒との共局在を示す CbHog1-Venus または共局在を示さない ScHog1-Venus を *C. boidinii* 内で発現させ細胞生育度を調べたところ、ScHog1-Venus 発現株において *C. boidinii* の生育度の低下が見られた。ScHog1-YFP 発現株において細胞生育度の低下が見られた原因を調べるため、ScHog1 の機能発現に必要なアミノ酸置換変異体（キナーゼ不活性変異体、リン酸化部位変異体、細胞膜アンカー型変異体）を作成した。これら変異体の高温ストレス条件下における細胞生育度を CbHog1-Venus 発現株、ScHog1-Venus 発現株とともに調べたところ、すべての ScHog1 変異体においてその細胞生育度が CbHog1-Venus 発現株と同レベルにまで回復した。これらの結果より、高温ストレス条件下においては、細胞内でリン酸化され活性化された Hog1 がキナーゼとして役割を果たさないよう細胞内に一時的に隔離しておくことが、酵母の高温ストレス時の生存戦略として重要であることが示された。また今回の結果は、ストレス顆粒が mRNA のみならずタンパク質の活性制御に関わることを示した例として意義深い。

1) 日置ら、日本農芸化学会関西支部第 493 回講演会講演要旨集、p.7 (2016)

Hog1, stress granule, heat tolerance

発表責任者：阪井康能（ysakai@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4C17a07
講演日時：3 月 20 日 11:00～ C 校舎 17 会場

# 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* を用いたアグマチン高生産

# Enhanced production of agmatine by *Aspergillus oryzae*

○加藤 彩織[1]、赤坂 直紀[2]、石井 友理[1]、秀瀬 涼太[1]、藤原 伸介[1] ([1]関学大理工、[2]マルカン酢(株))
○ Saori Kato[1], Naoki Akasaka[2], Yuri Ishii[1], Ryota Hidese[1], Shinsuke Fujiwara[1] ([1]Kwansei-Gakuin Univ., [2]Marukan Vinegar Co. Ltd.)

【背景】低分子の塩基性物質であるポリアミン(PA) (プトレスシンやスペルミジンなど)は、寿命伸長作用、記憶力や学習能力の増強、及び腸管の慢性炎症を緩和・改善する等の生理活性作用を有する事から、生活の質を向上しうる機能性物質として大きな関心を集めている(1)。PA の一種であるアグマチン(Agm)の生理活性も近年集中的に解析されており、生活習慣病に起因する諸症状を改善する事が明らかにされた(2)。従って、Agm を著量含有する食品は、様々な健康増進作用を発揮すると期待される。一般に発酵食品は PA 含量が高く、特に清酒は Agm に富む事(~ 2 mM)が広く知られている(3,4)。従って、Agm 産生・蓄積は、清酒醸造に関与する微生物群(酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、黄麹菌 *Aspergillus oryzae*、硝酸還元菌、乳酸菌等)の代謝に起因すると考えられていたが、その詳細は不明であった(3-5)。
【結果と考察】上記を踏まえ、初めに、黄麹菌の Agm 生産能を、蒸米培地を用いた糖化実験により検証した。培養上清に含まれるポリアミンを高速液体クロマトグラフィーにより分析した結果、約 4 mM の Agm が検出された。精製糖化酵素(α-アミラーゼ及びグルコアミラーゼ)を用いて調製した糖化液からはいかなるPAも検出されなかった事、並びに先行知見(3,4)から、Agm を産生する主たる微生物は黄麹菌である事が示された。続いて、用途の異なる黄麹菌(清酒用及び醤油用)の Agm 生産能を同様の蒸米糖化実験で解析したところ、清酒用黄麹菌のみが著量の Agm を培地中に蓄積した。更にその蓄積量は、L-乳酸やクエン酸等の有機酸を培地に添加する事で著しく上昇し、最大約 9 mM の Agm 蓄積が観察された。清酒醸造における酒母(酵母前培養液)調製の際には、乳酸菌の増殖誘導や L-乳酸を添加する事で雑菌汚染を抑止すること、さらに酵母も様々な有機酸を産生する事から、黄麹菌は常に酸性環境に暴露されていると考えられる。特に、バクテリアや子嚢菌等の微生物において、ポリアミン産生・排出は、耐酸性の獲得と密接に関連している事が知られており(6,7)、黄麹菌においても類似の耐酸性機構の存在が示唆された。今後は、Agm 生合成酵素(アルギニン脱炭酸酵素、ADC)遺伝子の同定並びにその転写量解析、更に ADC の速度論的解析を行う予定である。

(1)Kibe et al. 2014. Sci. Rep. 4:4548. (2) Nissim et al. 2014. J. Biol. Chem. 289:9710. (3) Okamoto et al. 1997. Biosci. Biotech. Biochem. 61:1582. (4) Galgano et al. 2012. Front. Microbiol. 3:199. (5)加藤ら. 2016. 第 68 回日本生物工学会. (6) Albertsen et al. 2003. J. Biol. Chem. 278:12820. (7) Chattopadhyay and Tabor. 2013. J. Biol. Chem. 288:33559.

agmatine, polyamines, *Aspergillus oryzae*

講演番号：4C17a08
講演日時：3 月 20 日 11:15～ C 校舎 17 会場

# エチル α-D-グルコシド(α-EG)の線維芽細胞に与える効果

Effect of ethyl α-D-glucoside (α-EG) on fibroblast

○三谷 恵一[1]、大浦 友紀[1]、坊垣 隆之[1,2]、尾関 健二[2,3] ([1]大関（株）・総研、[2]金工大・院・工・バイオ化学、[3]金工大・バイオ化学・応用バイオ)
○Keiichi MITANI[1], Yuki OURA[1], Takayuki BOGAKI[1,2], Kenji OZEKI[2,3] ([1]Ozeki co.ltd., [2]KIT graduate, [3]Kanazawa IT)

【背景及び目的】
エチル α-D-グルコシド(α-EG)は、清酒中に 1%(w/v)以下の濃度で含有されており、甘味と遅効性の苦味を持つ成分である。清酒ではもろみ中に存在するマルトースやマルトオリゴ糖とエタノールを基質として、麹菌の生産する α-グルコシダーゼの糖転移反応によって生成される。α-EG は清酒の呈味に影響を与えるだけでなく、皮膚へ塗布することによって荒れ肌改善の効果が報告されている。また我々は、2015 年本学会大会において α-EG の皮膚への塗布による保湿効果を報告している。そこで本研究では、皮膚を構成する細胞である線維芽細胞に対する α-EG の効果を明らかにすることを目的とした。
【方法】
正常ヒト線維芽細胞(NHDF)を D-MEM 培地を用いて培養を行った。NHDF をサブコンフルエントに達するまで培養し、得られた細胞を新しいプレートに播種し α-EG を添加したものを各評価用のサンプルとした。コントロール区には α-EG の代わりに蒸留水を添加したものを用いた。NHDF に対する増殖促進効果について MTT アッセイを用いて評価した。またコラーゲンについて培養上清中の I 型コラーゲン量を ELISA 法にて測定した。さらに RT-qPCR 法により NHDF 中の線維芽細胞増殖因子(FGF1、FGF2、FGF7)やコラーゲン(COL1A1、COL1A2、COL3A1、COL4A1)、エラスチン(ELN)などの遺伝子の発現量を測定した。
【結果】
α-EG 添加区ではコントロール区と比較し MTT アッセイによって NHDF の増殖促進効果が認められた。さらに線維芽細胞増殖因子(FGF1)の遺伝子の発現量についても有意に増加していることがわかった。この結果より、α-EG は線維芽細胞の増殖を促進することが示唆された。さらに培養上清中の I 型コラーゲン量についても α-EG 添加区で有意に上昇していた。またコラーゲン(4 種)及びエラスチン遺伝子の発現量も有意に増加していた。

ethyl α-D-glucoside, FGF, fibroblast

発表責任者：三谷　恵一（keiichi.mitani@ozeki.co.jp）

講演番号：4C17a09
講演日時：3 月 20 日 11:30～ C 校舎 17 会場

# ビス型第四アンモニウム塩を用いた高粘度培養液からの簡便なポリグルタミン酸回収法の検討と生じた複合体の利用

# Development of a convenient recovery method of polyglutamic acid from the high viscosity culture broth using a bis-quaternary ammonium compound and utilization of the ion complex

○劉 涛[1]、延嶋 浩文[2]、尾島 由紘[1]、東 雅之[1] ([1]大阪市立大学、[2]タマ化学工業株式会社)
○Tao LIU[1], Hirobumi NOBESHIMA[2], Yoshihiro OJIMA[1], Masayuki AZUMA[1] ([1]Osaka city Univ., [2]Tama Kagaku Kogyo Co., Ltd.)

γ-ポリグルタミン酸（γ-PGA）は，D-グルタミン酸と L-グルタミン酸からなり，D 体あるいは L 体のみから構成される場合と，D 体と L 体が混合している場合がある。微生物では，一般には分子量は数 10 万から 200 万程度の γ-PGA を生産するが，300 万を超える高分子 γ-PGA を生産する場合もあり，培養液中の粘性は非常に高くなる。また，γ-PGA は生可分解性で優れた生物適合性を持つため、増粘剤や保水剤として食品や化粧品に応用されている。分子内に多くのカルボキシル基を持ち，その電荷を利用した高分子凝集剤としても利用されている。これまでに，微生物による γ-PGA の生産が検討されており，ほとんどの場合 *Bacillus* 属細菌が用いられ，20 g/L 以上の高生産も報告されている。γ-PGA 生産量が増加すると，培養液の粘度も高まり，その回収は難しくなる。

我々は、培養液中に汚泥凝集物質を生産する微生物を自然界から探索し，分子量が 400 万以上の γ-PGA（D:L=12:15−16）を生産する菌株 *Bacillus* sp. RK14 を取得した。さらに，変異処理による育種を行い，γ-PGA 高生産変異株 *Bacillus* sp. RK14-46 を得た。三角フラスコを用いた振とう培養では，最大21g/L を生産した。高分子量の γ-PGA を高生産した場合，粘度が非常に高くなった。γ-PGA の回収は，pH 低下による沈殿回収も知られているが，構造が壊れることが危惧された。この時の γ-PGA の回収は，培養液を水で適宜希釈して粘性を下げた後，遠心分離で菌体を除去し，その上清に2倍量のエタノールを添加し沈殿物として回収した。γ-PGA は第四級アンモニウム化合物と複合体を形成することが知られている。我々も，以前にビス型第四級アンモニウム抗菌剤である 1,4-ビス(3,3’-(1-デシルピリジニウム)メチルオキシブタンジブロマイド（商品名：ハイジェニア）が γ-PGA とイオン結合し，不溶性複合体を形成することを確認した。また，その複合体はガラスなどへの付着性が高かった。

今後 γ-PGA の用途が広まるとともに，医療用途などで高純度の γ-PGA が求められる場合も予想される。本研究では，上述の複合体形成を利用し，高粘度培養液からの高純度で高効率な γ-PGA 回収方法の検討を行った。さらに，培養液へのビス型第四級アンモニウム抗菌剤の添加により生じた複合体を，直接利用する方法も検討した。それら結果を併せて報告する。

bis-quaternary ammonium compound, *Bacillus*, γ-Polyglutamic acid

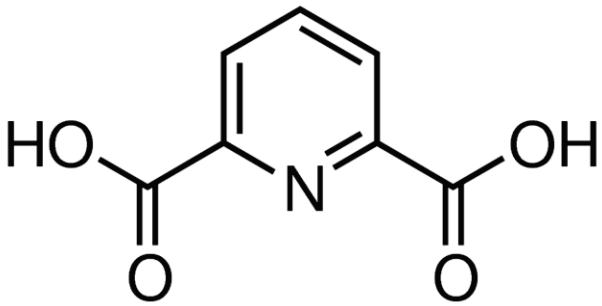
発表責任者：東　雅之（azuma@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp）

講演番号：4C17a10
講演日時：3 月 20 日 11:45～ C 校舎 17 会場

海洋性微生物のジピコリン酸生産性評価
Evaluation of dipicolinic acid productivity of marine microorganisms
○高野 仁美、阪本 鷹行、櫻谷 英治（徳島大・生物資源）
○ Hitomi TAKANO, Takaiku SAKAMOTO, Eiji SAKURADANI (Fac. Biosci. Bioindus., Tokushima Univ.)

**【目的】***Bacillus* 属や *Clostridium* 属などの細菌は特定のストレス下において芽胞を形成する。芽胞の主要構成成分であるジピコリン酸（2,6-ピリジンジカルボン酸）はニコチン酸アミドの類縁化合物であり、抗菌、抗ウイルス、抗酸化作用があることが知られている。また、ジピコリン酸は熱安定性が高い、食経験がある、人体への毒性が低いといった観点から、医薬品、食品、化粧品、建築材等の様々な産業分野において利用が期待されている。本研究では、海洋生物の共生菌ライブラリよりジピコリン酸生産菌を見い出し、その生産性を評価したので報告する。

**【方法・結果】**海洋生物の臓器の一部を滅菌海水で懸濁し、好気条件または嫌気条件にて共生菌の単離を行った。単離した好気性および嫌気性菌をそれぞれ培養し、菌体の脂質をガスクロマトグラフィーを用いて分析した結果、アイナメおよびスズメダイの腸由来の好気性菌 5 株（FTSD a-1, FTD b-1, 2, 3, 4）においてジピコリン酸が検出された。16S rDNA 配列における同定の結果、FTSD a-1 は *Lysinibacillus varians*、FTD b-2 と FTD b-3 はいずれも *Bacillus* 属の菌であることが示唆された。*Lysinibacillus. fusiformis* NBRC15717 および *Lysinibacillus. sphaericus* NBRC15095 を標準菌株とし、生育度、ジピコリン酸生成量を比較したところ、FTD b-2 と FTD b-3 は他の 3 株よりも生育度が良く、それに伴いジピコリン酸生成量も 3 株を大きく上回った。次に、芽胞形成を促す目的で振盪培養直後に 80℃、90 秒の熱処理を行ったところ、FTSD a-1 および *L. fusiformis* NBRC15717 において未処理の場合よりも約 3 倍以上のジピコリン酸生成が確認された。一方、FTD b-2 と FTD b-3 は熱処理に関わらずジピコリン酸を高生産することが示された。一方、*L. sphaericus* NBRC15095 はいずれの培養条件でもジピコリン酸を全く生産しなかった。



ジピコリン酸（2,6-ピリジンジカルボン酸）

dipicolinic acid, *Lysinibacillus*, endospore

発表責任者：櫻谷英治（sakuradani.eiji@tokushima-u.ac.jp）

講演番号：4C18a01
講演日時：3 月 20 日 09:20～ C 校舎 18 会場

# 分裂酵母 D-アラビノース脱水素酵素遺伝子のスクリーニング

# Screening of D-arabinose dehydrogenase gene in fission yeast

○尼子 克己[1]、大倉 未奈子[1]、竹澤 有美[1]、東 慶直[2]、田中 克典[3]([1]仁愛大人間生活、[2]近畿大生物理工、[3]関学大理工)
○Katsumi Amako[1], Minako Ohkura[1], Yumi Takezawa[1], Yoshinao Azuma[2], Katsunori Tanaka[3] ([1]Jin-Ai Univ., [2]Kindai Univ., [3]Kwansei Gakuin Univ.)

真菌類にはアスコルビン酸は通常見いだされず、その C5 アナログであるエリスロアスコルビン酸(eAsA)が検出される。我々は出芽酵母において、$NAD^+$依存 D-アラビノース脱水素酵素(ARA2)が高等植物の L-ガラクトース脱水素酵素とオーソログの関係にあり、D-アラビノースからの eAsA 合成に決定的な役割を果たすことを報告した[*FEBS Lett.* 580: 6428 (2006)]。一方、分裂酵母にも eAsA が見いだされ、D-アラビノースの添加によって eAsA 量は増加するが、分裂酵母ゲノム中には出芽酵母 ARA2 のオーソログが認められず、出芽酵母に L-ガラクトースを与えると AsA を生産するのに対し、分裂酵母では AsA を生じない（2016 年度本学会大会にて発表)。本研究では、分裂酵母の D-アラビノース脱水素酵素(ARA)の探索を行った。

分裂酵母ゲノムから dehydrogenase に分類される遺伝子を抽出し、分裂酵母 Deletion mutant library (Bioneer)内にある当該遺伝子の破壊株を 0.1% D-アラビノースを含む 40 mL の YES 培地で定常期まで培養した。菌体を遠心で回収後、等容(w/v)の 20%トリクロロ酢酸で可溶性画分を抽出した。この水溶液に含まれる eAsA を HPLC-電気化学検出法(600 mV vs. Ag/AgCl)で測定した。

各試料の測定結果でヒストグラムを作成すると、測定値の（平均－2xSD）付近に分布を示す数株が見いだされた。次にこれらの株について、培養時の D-アラビノースの有無によって起こる eAsA 量変化の比率を測定した。これらによって ARA である可能性が高い遺伝子について、他の方法による検証を行っている。また、配列情報に依存せず包括的に Mutant Library から eAsA 量に基づくスクリーニングを行うための技術的障壁についても検討を行った。

yeast, erythroascorbic acid, dehydrogenase

発表責任者：尼子克己（amakok@jindai.ac.jp）

講演番号：4C18a02
講演日時：3 月 20 日 09:35～ C 校舎 18 会場

分裂酵母 *S. pombe* における前胞子膜の外膜溶解に関わる遺伝子の同定と解析
Identification and analysis of fission yeast *S. pombe* genes involved in the lysis of the outer forespore membrane
○張 博文、今田 一姫、寺口 絵理香、田原 悠平、宮田 真人、中村 太郎（大阪市大院理）
○Bowen ZHANG, Kazuki IMADA, Erika TERAGUCHI, Yuhei TAHARA, Makoto MIYATA, Taro NAKAMURA (Osaka City Univ.)

＜目的＞

栄養源が枯渇した環境下で、分裂酵母 *S. pombe* 細胞は接合、減数分裂を経て、胞子を形成する。胞子は、有機溶媒や酵素など様々なストレスへの耐性を持つ休眠細胞である。胞子細胞膜の前駆体である前胞子膜は、スピンドル極体（SPB）から形成が開始され、その後、伸張して、核を包みこむ。前胞子膜は内膜と外膜からなる二重膜であり、それらの膜の間に、胞子壁の材料となる成分が蓄積し、胞子壁が形成されていく。その後、外膜は溶解し、内膜は胞子細胞膜になり、胞子が完成する。本研究は、前胞子膜外膜の溶解に関わる遺伝子の取得と解析を通して、その分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

＜方法及び結果＞

我々は、胞子形成に異常を示す突然変異株を数多く取得している。前胞子膜を GFP で可視化し、蛍光顕微鏡で観察した時、溶解しない外膜が観察される変異株を 2 つ取得した（*spoE22* と *spoE28*）。急速凍結レプリカ電子顕微鏡法での観察により、これらの変異株では二重の前胞子膜が観察された。さらに、野生型株の胞子では表面に凸凹構造が観察されたが、*spoE22* と *spoE28* の胞子ではこのような構造は見られず、表面が平坦であった。原因遺伝子を取得したところ、この 2 つの株における変異は同じ遺伝子 *meu5*$^+$に生じたものだった。*meu5*$^+$は mRNA 結合タンパク質をコードし、その標的遺伝子は約 80 あることが知られている。したがって、*meu5*$^+$は、前胞子膜外膜の溶解に直接関わる遺伝子の mRNA の安定化を介して、外膜の消失に関わると考えられる。現在、これら *meu5*$^+$のターゲット遺伝子の取得を試みている。

yeast, spore, membrane

発表責任者：張 博文（bowenchn1313@gmail.com）

講演番号：4C18a03
講演日時：3 月 20 日 09:50～ C 校舎 18 会場

# 酵母由来 GPI アンカー型グルカノシルトランスフェラーゼによる耐酸性・耐塩性の強化

# Enhancement of acid and salt tolerance by GPI-anchored glucanosyltransferases from yeast

○松鹿 昭則[1,2]、鈴木 俊宏[1]、五島 徹也[3]、星野 保[1,2] ([1]産総研・機能化学、[2]広島大院・先端物質、[3]酒総研)
○Akinori MATSUSHIKA[1,2], Toshihiro SUZUKI[1], Tetsuya GOSHIMA[3], Tamotsu HOSHINO[1,2] ([1]ISC, AIST, [2]Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., [3]NRIB)

草本や木質由来のバイオマスからのエタノールや乳酸の生産において、前処理・糖化工程で使用される酸や中和で生成する塩が環境ストレスとして酵母に負荷されるため、これらストレス源に対して耐性が向上した酵母を育種することが、中和コスト低減や雑菌汚染防止等の観点から望まれる。最近我々は、多ストレス耐性酵母 *Issatchenkia orientalis* のゲノムライブラリーから、酸耐性・塩耐性を付与する GPI アンカー型タンパク質 IoGas1 を同定した。IoGas1 を出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）において恒常的に発現することにより、通常では生育不可能な低 pH（pH2.0～2.2）や低 pH・高濃度塩（pH2.5, 5.0～7.5% $Na_2SO_4$）のストレス条件下でも効率的に生育及びエタノール発酵させることに成功している。今回は、IoGas1 の転写発現や出芽酵母 *gas1* 破壊株を用いた解析を行った。その結果、IoGas1 の遺伝子発現については、pH3.0 から 2.0 にかけて段階的に増加して pH2.0 で最大となる pH 依存性を示し、硫酸塩存在下では、pH 値に関わらず発現量が上昇した。また、IoGas1 は *gas1* 破壊株の増殖及び形態上の異常を相補したことから、出芽酵母 Gas1 との機能的類似性が認められた。さらに、部位特異的変異の手法を用いた検討により、酸耐性・塩耐性には IoGas1 の β-1,3-グルカノシルトランスフェラーゼ活性が必須であることを明らかにした。加えて、出芽酵母 Gas1 の酸耐性・塩耐性効果についても併せて検討したので、これらの結果をもとに、一連の GPI アンカー型タンパク質によるストレス耐性化における役割について考察する。

*Issatchenkia orientalis*, acid and salt tolerance, yeast stress response

発表責任者：松鹿昭則（a-matsushika@aist.go.jp）

講演番号：4C18a04
講演日時：3 月 20 日 10:05～ C 校舎 18 会場

# 分裂酵母 *S. japonicus* の CoQ 生合成酵素遺伝子の相補試験及び基質化合物の添加による合成量への影響

# Complementation analysis of CoQ biosynthetic genes and the effect on CoQ biosynthesis by addition of substrates in fission yeast *S. japonicus*

○渡子 開、望月 汐美、戒能 智宏、川向 誠 (島根大生物資源科学)
○Kai TONOKO, Shiomi MOCHIZUKI, Tomohiro KAINO, Makoto KAWAMUKAI (Shimane Univ.)

【背景・目的】　コエンザイム Q(CoQ)は、呼吸鎖における電子伝達系の必須成分であり、抗酸化能も有しているため生育のために重要な物質である。分裂酵母 *S. pombe* の CoQ 欠損株は、最少培地での生育遅延、酸化ストレス感受性、硫化水素発生、非発酵性培地での生育不能など様々な表現型を示すことが知られている。分裂酵母 *S. japonicus* は、モデル生物である *S. pombe* より細胞が大きく、42℃の高温でも生育するうえ、生物に必須である CoQ を極微量しか合成していないことから、非発酵性培地で生育することができず、酸素消費はごくわずかであるという特徴をもった分裂酵母である。しかし、CoQ の生合成に関わる遺伝子は全てゲノム上に保存されており、CoQ の側鎖合成酵素遺伝子である *Sjdps1* と *Sjdlp1* は、*S. pombe* の各遺伝子破壊株を相補することが分かっている。そこで、今回は新たに側鎖転移酵素遺伝子である *Sjppt1* と機能未知の *Sjcoq9* 遺伝子の相補試験を行った。また、嫌気条件における生育の比較と、CoQ 生合成の基質類を培地に添加した時の CoQ 生産性への影響について実験を行った。
【方法・結果】　側鎖転移酵素遺伝子である *Sjppt1* と機能未知である *Sjcoq9* を *S. pombe* の各遺伝子破壊株に導入したところ、*Sjppt1* を導入した株においては最少培地での生育遅延の回復及び CoQ 生合成能の回復が見られた。しかし、*Sjcoq9* を導入した株では *Sjppt1* の場合とは異なり機能を相補しなかった。次に、嫌気条件において生育試験を行った結果、*S. pombe* の CoQ 欠損株の生育が特に遅くなるのに対して、*S. japonicus* は好気条件の場合と同程度に生育したうえ、*S. cerevisiae* や *S. pombe* と比べても生育が早かった。次に、CoQ 生産性を検討するため、CoQ 生合成の基質である *p*-hydroxybenzoic acid (PHB)や出芽酵母では基質として用いられる *p*-aminobenzoic acid (pABA)、CoQ 生合成の中間体類似物質の vanillic acid (VA)を最少培地に加え、野生株を用いて生育試験を行った。その結果、pABA、pABA と PHB の両方、VA を高濃度(1mg/ml)で加えたときには、生育が強く阻害されたが、PHB や低濃度(0.1mg/ml)の添加では無添加の時と生育にほとんど差はみられなかった。低濃度で基質類を添加した完全培地と最少培地で培養し CoQ 抽出を行ったところ、ともに PHB、PHB と pABA の両方を添加した時に CoQ の量が増加した。さらに、$^{13}C$ でラベルされた PHB と pABA の安定同位体を最少培地に添加して培養し、抽出した CoQ を LC-MS/MS を用いて解析したところ、フラグメント化したキノン骨格部分の *m/z* が増加して検出されたことから、*S. japonicus* は培地に添加した PHB や pABA を基質として CoQ の合成を行うことができることが示唆された。

*S. japonicus*, coenzyme Q, fission yeast

講演番号：4C18a05
講演日時：3 月 20 日 10:20～ C 校舎 18 会場

植物生長促進作用に関与する *Pseudomonas fluorescens* 遺伝子の単離
Isolation of *Pseudomonas fluorescens* genes involved in plant growth promotion effect.
○中岡 知規[1]、澤田 祥子[2]、大浦 麻里[1]、田中 雄矢[2]、阿野 貴司[1,2]、岡南 政宏[1,2] ([1]近畿大院、[2]近畿大)
○Tomonori Nakaoka[1], Shoko Sawada[2], Mari Ooura[1], Yuya Tanaka[2], Takashi Ano[1,2], Masahiro Okanami[1,2] ([1]Grad. Sch. Biol. Ortd. Sci. Technol., Kindai Univ., [2]Fac. Biol. Ortd. Sci. Technol., Kindai Univ.)

【緒言】

植物生長促進細菌(plant growth-promoting bacteria: PGPB)と呼ばれる土壌細菌は、植物に対して直接的または間接的にその生長を促進する。PGPB は、植物ホルモン様物質の産生、リン、鉄、亜鉛の可溶化などを行っていると考えられる。また、一部の PGPB では植物生長促進(PGP)作用に加え、植物病原菌の増殖を抑制する作用も併せ持つことが知られている。これまでに我々は、シロイヌナズナの芽生えの側根伸長を促進する *Pseudomonas fluorescens* A-2 株を単離している。これは揮発性物質を放出することによってシロイヌナズナの生長を促進しているようであった。さらに、*Fusarium oxysporum* や *Phytophthora infestans* などの植物病原菌の増殖を抑制する働きを持つことがわかった。このような PGPB を利用した微生物農薬は、化学農薬に代わって、植物の生長、植物病原菌への耐性や環境ストレスへの耐性のための安全な添加物として期待することができる。

【方法および結果】

我々は、植物生長促進(PGP)作用に関わる遺伝子を同定するために、*P. fluorescens* A-2 株に亜硝酸処理を行い、A-2 株の変異体プールを作製した。スクリーニングの結果、シロイヌナズナの側根伸長を促進しない変異株を複数単離することができた。次いで、得られた変異株の 1 つである A-2(C37)株に野生型 A-2 株のゲノム DNA 断片を導入した。導入によって再び PGP 作用を示すことができるようになった A-2(C37)復帰株を選抜した。A-2(C37)復帰株に導入された DNA 断片は、およそ 4 kbp の断片であり、データベースとの照合によって、3 つの遺伝子が含まれていることがわかった。本大会では、これらの 3 つの遺伝子について、どれが PGP 作用を担っているのか、どのように機能しているのかなどについて報告する。

Plant Growth Promotion, *Pseudomonas fluorescens*

講演番号：4C18a06
講演日時：3 月 20 日 10:35～ C 校舎 18 会場

# 大腸菌における新規 *yafDyafE* toxin-antitoxin system の同定及び機能解析

# Identification of a novel toxin-antitoxin system, *yafDyafE*, in *Escherichia coli*

○中嶋 菜衣[1]、横井 亮磨[1]、山口 良弘[1,2] ([1]阪市大理、[2]阪市大複合先端研)
○Nae NAKAJIMA[1], Ryoma YOKOI[1], Yoshihiro YAMAGUCHI[1,2] ([1]Osaka City Univ., [2]OCARINA)

【目的】　近年、ほぼすべての原核生物に数多くの toxin-antitoxin (TA) と呼ばれるシステムが存在し、細胞の生育及び細胞死を制御していることが明らかになってきている。一般的に toxin 及び antitoxin 遺伝子はそれぞれ非常に小さな遺伝子でオペロンを形成している。Toxin は菌体内で発現すると宿主自身に対して毒性を示し、antitoxin は toxin と複合体を形成しその毒性を中和する。ストレス条件下において、antitoxin はストレス誘導性プロテアーゼにより分解され、toxin が複合体から遊離する。その結果、toxin により生育阻害さらには細胞死が引き起こされる。各 toxin の標的は非常に多岐に渡っており、DNA 複製、mRNA の安定性、タンパク質合成及び細胞壁合成などを阻害する。個々の TA system 及び toxin の標的の同定、作用機構及び発現制御機構の解明を含む性質解析は、原核生物の生理機能、病原性及び進化の理解に必須である。しかし、TA system を同定するモデルはまだ確立されておらず、どれほどの TA system が存在しているかさえ不明である。今回我々は、*Escherichia coli* K12 に 17 の TA system 候補遺伝子を見出した。解析の結果、YafD が toxin として機能する *yafDyafE* TA system を同定した。さらに、YafD は静菌的に作用し、YafD の過剰発現は *in vivo* で RNA 合成を阻害することを見出した。

【方法及び結果】　*E. coli* K12 の全遺伝子から比較的短い 2 つの遺伝子から成るオペロンで機能未知のものを探索し、17 のオペロンを TA system 候補とした。今回我々は *yafD* (798 bp)-*yafE* (621 bp) オペロンに着目した。pET28a-*yafD* を有する大腸菌は、0.08 mM IPTG を含む M9 寒天培地で生育しなかった。一方、YafD 及び YafE を共発現させた結果、大腸菌は生育した。よって、YafD が toxin、YafE が antitoxin の TA system として機能することが示された。液体培地を用いて YafD 発現後の生育を測定した。YafD 誘導後およそ 3 世代後から生育は阻害されたが生菌数の減少は見られなかった。よって、YafD は大腸菌に静菌的に作用することが明らかとなった。次に、YafD の細胞内標的を同定するために、YafD 発現後の DNA、RNA 及びタンパク質合成を *in vivo* で解析した。その結果、RNA 合成は YafD 誘導 60 分後に抑制されたが、DNA 及びタンパク質合成はほとんど阻害されなかった。YafD 発現後の RNA 安定性を Northern blotting により解析した結果、分解産物は確認されず full-length RNA の減少が観察された。以上の結果から、YafD の標的は RNA polymerase であることが示唆された。現在詳細を解析中である。

Toxin-antitoxin system, RNA polymerase, *E. coli*

講演番号：4C18a07
講演日時：3 月 20 日 11:00～ C 校舎 18 会場

# ゲノム編集による *Kluyveromyces marxianus* の自在な遺伝子改変

# Advanced genome engineering of *Kluyveromyces marxianus* by CRISPR/Cas9 and targeted deaminase

○南部-西田 由美子[1,2]、西田 敬二[3]、蓮沼 誠久[3]、近藤 昭彦[1,3]（[1]神戸大院・工、[2]高機能遺伝子デザイン技術研究組合、[3]神戸大院・イノベ）
○Yumiko NAMBU-NISHIDA[1,2], Keiji NISHIDA[3], Tomohisa HASUNUMA[3], Akihiko KONDO[1,3]
([1]Grad. Sch. Eng., Kobe Univ., [2]TRAHED, [3]Grad. Sch. Sci. Tech. Innov., Kobe Univ.)

【背景】
耐熱性酵母として物質生産への応用が期待される *Kluyveromyces marxianus* は、相同組み換え活性よりも非相同末端結合(NHEJ)活性が高いと考えられ、DNA 断片がランダムな部位へ導入されやすい特徴をもつ。しかし、より高度なゲノム機能改変を行うためには特定標的部位への遺伝子のノックイン、ノックアウトを高効率で行える技術を確立する必要がある。
本研究では、切断型ゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 および一塩基変換ゲノム編集技術である Target-AID(nCas9 デアミナーゼ)技術を導入すると共に、NHEJ 遺伝子破壊株を作成することによって、*K. marxianus* における高効率なゲノム改変技術を実現することを目的とする。
【方法および結果】
*K. marxianus* で機能させることができる CRISPR/Cas9 および nCas9 デアミナーゼベクターを構築した。まずこれを用いて NHEJ に関わる遺伝子 *Nej1*, *Dnl4* をターゲットとして nCas9 デアミナーゼにより 1 塩基変換を試みた結果、標的アミノ酸コドンを終始コドンに変換することで *Nej1*, *Dnl4* 遺伝子欠損株を作成することができた。作成株の Ura3 遺伝子領域へのノックインを行なったところ、野生株に比べ *Nej1* および *Dnl4* 欠損株において、より偽陽性がなく、目的の形質転換体を得ることができた。さらに、CRISPR/Cas9 を併用して標的部位の切断によって相同組み換えを促進したところ、高効率なノックインが可能となり、挿入マーカーを用いずに、また短い相同配列(～50 塩基)でも容易に導入ができるようになった。
なお、本研究は国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）の『次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発』の支援によって行われた。

*Kluyveromyces marxianus*, thermo-tolerant yeast, genome editing

発表責任者：近藤　昭彦（akondo@kobe-u.ac.jp）

講演番号：4C18a08
講演日時：3 月 20 日 11:15～ C 校舎 18 会場

コリネ型細菌における転写終結因子 Rho の発現制御
Regulation of expression of the transcription termination factor Rho in Corynebacterium glutamicum
○田中 裕也[1]、竹本 訓彦[1]、山本 祐司[2]、乾 将行[1,2] ([1]RITE、[2]奈良先端大・バイオ)
○ Yuya TANAKA[1], Norihiko TAKEMOTO[1], Yuji YAMAMOTO[2], Masayuki INUI[1,2] ([1]RITE, [2]NAIST)

【目的】我々は有用工業微生物 *Corynebacterium glutamicum* を用いて様々な物質生産に取り組んでいる。物質生産効率の向上には代謝遺伝子の発現を厳密に制御する必要がある。しかしこれまでの *C. glutamicum* の遺伝子発現制御に関する研究は多くが転写開始制御の段階であり、転写開始後については限られていた。そこで我々は、転写終結因子 Rho についてその発現制御を解析し、*C. glutamicum* における転写後制御との関連を明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】 我々はこれまでに *C. glutamicum* の *rho* mRNA 量は RNase EG をコードする *rneG* 遺伝子破壊により上昇することを報告している[1]。今回我々は他の RNase をコードする遺伝子の破壊株を作成し、*rho* 遺伝子発現に対する影響を調べた。その結果、*rneG* 以外の遺伝子破壊株では *rho* mRNA 量に変化が認められなかったことから *rho* mRNA は主に RNase EG によって分解されていることが明らかとなった。ノーザンブロット解析から RNase EG による切断点は *rho* 遺伝子の 3'末端付近に存在することが示唆された。また最少培地から栄養培地に培地変換することにより *rho* の発現が増加した。mRNA の安定化は見られなかったことからこの発現上昇は、RNA 分解以外の機構によるものと考えらえた。*rho* の発現は大腸菌等、他の細菌では転写伸長段階での自己制御が報告されている。そこで *rho* の自己制御領域を欠損させた株で調べたところ、自己制御領域欠損により栄養培地での発現上昇は見られなくなった。以上の結果から Rho の活性が栄養培地中の成分により制御されていることが示唆された。

1. Takemoto N., *et. al.*, Nucleic Acids Res. **43(1)**, 520-529, (2015)

Corynebacterium glutamicum, posttranscriptional regulation, Rho

発表責任者：田中裕也（tanakayu@rite.or.jp）

講演番号：4C18a09
講演日時：3 月 20 日 11:30～ C 校舎 18 会場

# アラビノキシラン利用能を有するコリネ型細菌の創製

# Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for arabinoxylan utilization.

○久下 貴之[1,2]、渡邉 彰[2]、長谷川 智[2]、寺本 陽彦[2]、乾 将行[1,2] ([1]奈良先端大、[2]RITE)
○ Takayuki KUGE[1,2], Akira WATANABE[2], Satoshi HASEGAWA[2], Haruhiko TERAMOTO[2], Masayuki INUI[1,2] ([1]NAIST, [2]RITE)

【目的】キシランはセルロースに次いでリグノセルロース系バイオマスの主要な構成成分であり、稲わら等の農業残渣及び草本系エネルギー作物では主に、アラビノフラノシドが側鎖に結合したアラビノキシランとして存在している。リグノセルロース系バイオマスを原料とした微生物発酵生産では、多糖であるセルロースやキシランの酵素糖化工程のコスト削減が課題となっており、微生物に多糖の直接利用能を付与できれば糖化酵素使用量の削減等が期待される。そこで本研究では、工業微生物である *Corynebacterium glutamicum* にアラビノキシランの直接利用能を獲得させることを目指した。
【方法と結果】これまで、*C. glutamicum* の近縁種である *Corynebacterium alkanolyticum* ゲノム上に、アラビノキシラン由来のキシロオリゴ糖（以下 XOS）及びアラビノキシロオリゴ糖（以下 AXOS）の両方を基質にできる取り込み体をコードする *xylEFG* 遺伝子と、β-キシロシダーゼをコードする *xylD* 遺伝子を同定した[1]。また、*xylEFGD* と大腸菌由来のキシロース資化遺伝子（*xylAB*）を導入した *C. glutamicum* 遺伝子組換え株が、XOS の利用能を獲得することを明らかにした[1]。しかし、AXOS は取り込まれた後に代謝されず細胞内に蓄積しており、これを利用するためにはアラビノフラノシド側鎖の切断酵素α-アラビノフラノシダーゼの導入が必要と考えられた。そこで、*C. alkanolyticum* から 2 つのアラビノフラノシダーゼ遺伝子（*abf51A* 及び *abf51B*）を単離し、その遺伝子産物を比較解析した結果、Abf51B が Abf51A よりも AXOS からアラビノース側鎖を切断する活性が高いことを明らかにし、*C. glutamicum* へのアラビノキシラン直接利用能の付与において好適であることが示唆された[2]。また、*C. alkanolyticum* ゲノム上の *xylE* 遺伝子上流に分泌型キシラナーゼをコードすると推定される *xylI* 遺伝子を見出し、大腸菌で異種発現させ精製した XylI がキシラナーゼ活性を有することを確認した[2]。本研究では、この *xylI* 遺伝子を導入した *C. glutamicum* のアラビノキシラン分解能を解析し、培養液中に分泌された XylI により、アラビノキシランから様々な XOS、AXOS が生成されることを明らかにした。生成された AXOS は、精製アラビノフラノシダーゼ（Abf51B）により XOS 及びアラビノースに分解されることを確認した。さらに、上記のキシロオリゴ糖利用能を獲得させた *C. glutamicum* に *abf51B* 及び *xylI* を追加導入した株をアラビノキシラン存在下で培養したところ、アラビノキシランの消費が認められ、培養液中にオリゴ糖が残存しないことを確認した。

1. Watanabe A., *et. al.*, Appl Environ Microbiol. 81(12), 4173-83, (2015)
2. 久下貴之等, “アラビノキシラン利用コリネ型細菌の構築”, 日本農芸化学会 2016 年度大会

*Corynebacterium*, Xylanase, Arabinofurnaosidase

講演番号：4C18a10
講演日時：3 月 20 日 11:45～ C 校舎 18 会場

*C. glutamicum* のグルコキナーゼ遺伝子の機能解析
Functional analysis of glucokinase genes in *Corynebacterium glutamicum*
○塚田 悠太[1,2]、小暮 高久[2]、乾 将行[1,2] ([1]奈良先端大・バイオ、[2]RITE)
○Yuta TSUKADA[1,2], Takahisa KOGURE[2], Masayuki INUI[1,2] ([1]NAIST, [2]RITE)

【目的】グルコースは多くの細菌において、ホスホエノールピルビン酸（PEP）をリン酸基供与体として用いる PEP 依存型のホスホトランスフェラーゼシステム（PTS）を介して、リン酸化と同時に細胞内に取り込まれる。しかしながら、近年、*C. glutamicum* において、従来 *myo*-イノシトール輸送体（非 PTS 経路）として知られていた IolT1、及び IolT2 が、PTS 欠損株における代替グルコース輸送体としても機能することが明らかになった。IolT1/IolT2 によって細胞内に取り込まれたグルコースは、グルコキナーゼによるリン酸化を受けることにより中央代謝系で代謝されて利用される。PTS は取り込まれたグルコースと等モル数の PEP を消費するのに対して、非 PTS 経路はグルコース取り込み時に PEP を消費しない。従って、PEP を起点として合成されるシキミ酸や各種芳香族化合物の高収率生産菌を育種するにあたっては、非 PTS 経路の導入、強化が有効であると考えられる。*C. glutamicum* R のゲノム中には、3 種のグルコキナーゼ遺伝子オルソログが存在する。本研究は、非 PTS 経路によるグルコース利用における、これら 3 種のグルコキナーゼ遺伝子の機能解明を目的とした。
【方法と結果】*ptsH* 遺伝子破壊により PTS による糖取り込み能を欠損させるとともに、*gapA* プロモーター制御下の *iolT1* 遺伝子を高発現させた株（⊿*ptsH/iolT1* 高発現）に対し、*C. glutamicum* R 株に存在する 3 種のグルコキナーゼ遺伝子（*cgR_2063* (*glk1*)、*cgR_2552* (*glk2*)、*cgR_1739* (*ppgk*)）を各々単独破壊、二重破壊、または三重破壊した株を作製した。これらの株についてグルコースを単一炭素源とする最少培地における増殖とグルコース消費能について調べた。⊿*ptsH/iolT1* 高発現をベースとした *ppgk* 破壊株では、グルコースでの生育の大幅な低下が観察された。また、*glk1* 破壊株では、グルコースでの生育能とグルコース消費能がともに親株に比べ低下した。大腸菌を用いて発現・精製した GLK1(*cgR_2063*)、及び GLK2(*cgR_2552*)について、酵素活性を測定したところ、GLK2 に比べて、GLK1 は Km 値が低く、グルコースに対する親和性が高いことが示された。現在、グルコキナーゼ遺伝子の多重破壊株の生育特性とグルコース消費能の解析、精製 PPGK(*cgR_1739*)の酵素特性の解析、各グルコキナーゼ遺伝子発現の解析を進めている。

*Corynebacterium glutamicum*, glucokinase, sugar metadolism

講演番号：4C18a11
講演日時：3 月 20 日 12:00～ C 校舎 18 会場

# コリネ型細菌における芳香族化合物に対するストレス耐性機構の解析

# Analysis of tolerance mechanism under aromatic compounds-induced stress in *Corynebacterium glutamicum*

○小倉 崚司[1,2]、久保田 健[2]、乾 将行[1,2]（[1]奈良先端大・バイオ、[2]RITE）
○Ryoji OGURA[1,2], Takeshi KUBOTA[2], Masayuki INUI[1,2] ([1]NAIST, [2]RITE)

【目的】芳香族化合物は付加価値の高い化合物であり、医薬品、樹脂、香料などの原料として様々な分野で汎用されている。現在主に石油を原料とした化学プロセスにより生産されているが、今後環境に負担の少ない微生物を用いたバイオプロセスによる生産が望まれる。しかし芳香族化合物は微生物に対して強い毒性を示すことが多くバイオプロセスによる高生産は困難とされてきた。このような化合物を生産するためには、「化合物の毒性」、「宿主のストレス耐性」を把握することが重要である。

*Corynebacterium glutamicum* はグルタミン酸をはじめとするアミノ酸の生産菌として広く知られている。我々の研究グループは *C. glutamicum* を用いた芳香族化合物の工業生産を目指しており、これまでに *C. glutamicum* が芳香族化合物であるフェノール、パラアミノ安息香酸(*p*-ABA)、パラヒドロキシ安息香酸(*p*-HBA)に対して高いストレス耐性を有していることを明らかにした。しかし上記の化合物以外の芳香族化合物においては、ストレス耐性に関する報告がない。本研究では様々な芳香族化合物のバイオプロセスによる工業生産を目的として、「化合物の毒性」、「宿主のストレス耐性」を評価した。

【方法・結果】*C. glutamicum* の代謝系に含まれる芳香族化合物を中心に 15 種類の化合物の毒性を定量化した。加えて工業生産菌として用いられる *Escherichia coli*、*Saccharomyces cerevisiae*、有機溶媒耐性菌として知られている *Pseudomonas putida* についても毒性評価を行い比較検討することで *C. glutamicum* のストレス耐性を評価した。

0 mM から 500 mM の各濃度で芳香族化合物を培地に添加し上記の供試株について培養試験を行なった。$OD_{600}$ の値より増殖曲線を作成し各芳香族化合物の増殖阻害率 50 %の濃度（$IC_{50}$）を決定した。その結果、*C. glutamicum* における *p*-ABA の $IC_{50}$ は 460 mM でオルトヒドロキシ安息香酸(*o*-ABA)は 300 mM であった。一方、*E. coli*、*S. cerevisiae*、*P. putida* における *p*-ABA 及び *o*-ABA の $IC_{50}$ は 100 mM 以下で著しい増殖阻害が確認された。

化合物の毒性の観点では、*o*-ABA と *p*-ABA の $IC_{50}$ が異なる結果となったことから官能基の位置により毒性の強さが異なることが示唆された。また各生物種の比較の観点では、供試株の内 *C. glutamicum* が芳香族化合物に対して最も高いストレス耐性を有していることが示された。これらの結果を踏まえ *C. glutamicum* の芳香族化合物に対するストレス耐性機構について考察する。

toxicity, benzoate, inhibition

発表責任者：乾 将行（inui@rite.or.jp）

講演番号：4C18a12
講演日時：3 月 20 日 12:15～ C 校舎 18 会場

コリネ型細菌におけるアスパラギン酸生合成酵素の機能解析と遺伝子発現解析
Functional analysis and gene expression analysis of the aspartic acid biosynthetic enzymes in *Corynebacterium glutamicum*

○土門 晃大[1,2]、福井 郁美[1,2]、須田 雅子[2]、西村 拓[2]、平賀 和三[2]、乾 将行[1,2]（[1]奈良先端大・バイオ、[2]RITE）
○Akihiro DOMON[1,2], Ikumi FUKUI[1,2], Masako SUDA[2], Taku NISHIMURA[2], Kazumi HIRAGA[2], Masayuki INUI[1,2] ([1]NAIST, [2]RITE)

【目的】　コリネ型細菌（*Corynebacterium glutamicum*）は、グルタミン酸やリジン等の各種アミノ酸の生産に利用されている。アスパラギン酸は、リジンやメチオニンなど産業上重要なアミノ酸の生合成に共通した代謝中間体である。*C. glutamicum* R 株のゲノム上にはアスパラギン酸生合成に関与する遺伝子として、オキサロ酢酸にグルタミン酸のアミノ基を転移してアスパラギン酸を生成するアスパラギン酸トランスアミナーゼ遺伝子 *aspB*、フマル酸とアンモニウムイオンからアスパラギン酸を生成するアスパルターゼ *aspA1*、*aspA2* 遺伝子が存在する。アスパラギン酸は、このような TCA 回路の中間体を経由する他に、アスパラギンからアスパラギナーゼ（*ansA*、*cgR_2808* 遺伝子）によっても生成されると推察された。このような背景のもと、本研究ではコリネ型細菌のアミノ酸高生産株の創製を目指した基盤情報を得ることを目的として、*C. glutamicum* R 株における上記のアスパラギン酸の生合成や代謝に関与する酵素の生理学的・生化学的な機能解析や、関連遺伝子の発現解析を行った。
【方法と結果】　*C. glutamicum* R 株のアスパラギン酸トランスアミナーゼ遺伝子である *aspB* 破壊株の増殖は野生株と比較して著しく低下したが、*aspA1*、*aspA2*、及び二重破壊株の増殖はいずれも野生株と同等であった。次に、*aspB* 破壊株にアスパルターゼ遺伝子 *aspA1* あるいは *aspA2* をプラスミドで高発現した結果、いずれも増殖が回復した。これらの結果からグルコースを唯一の炭素源とした場合、*aspB* は増殖に必須であり、*aspA1*、*aspA2* は増殖に必須でないが高発現によって *aspB* 破壊形質を相補可能であった。大腸菌を宿主として AspA1、AspA2 の C 末端側に 6xHis タグを付加した融合タンパク質を発現させ Ni-NTA カラムで精製して SDS-PAGE に供した結果、推定分子量と一致する単一のバンドを認めた。アスパラギン酸、フマル酸を基質に用いて酵素活性測定を行った結果、両酵素共に活性が検出され、実際に機能することが明らかになった。両酵素の至適温度、至適 pH、及び反応速度パラメーターについても併せて報告する。*cgR_2808* は、GntR ファミリー転写制御因子をコードする *cgR_2807*、アスパルターゼ遺伝子 *aspA2* そしてアスパラギンパーミアーゼ遺伝子 *cgR_2810* とともにクラスター（*cgR_2807-2808-aspA2-2810*）を形成していた。*C. glutamicum* ATCC13032 株のゲノム上には該クラスターが欠損していた。*C. glutamicum* R 株は、アスパラギンを主炭素源として増殖が可能であったが、ATCC13032 株は増殖不可能であった。R 株におけるアスパラギン酸の利用に該クラスターが関与していると考え、遺伝子破壊株を用いた解析や遺伝子の発現解析を進めている。

Corynebacterium glutamicum, aspartic acid, enzyme characteristics

発表責任者：乾将行（inui@rite.or.jp）

講演番号：4C19a01
講演日時：3 月 20 日 09:20～ C 校舎 19 会場

発酵熱の生成機構に関する研究（第 2 報）
Mechanism of fermentation heat production 2
○吉村 徹[1]、榊原 舞子[1]、伊藤 智和[1]、西村 圭祐[1]、高橋 克忠[2]、羽田 亜紀[2]、邊見 久[1]([1]名大院生命農学、[2]けいはんな文化学術協会 微生物計測システム研究所)
○ Tohru YOSHIMURA[1], Maiko SAKAKIBARA[1], Tomokazu ITO[1], Keisuke NISHIMURA[1], katsutada TAKAHASHI[2], Aki HADA[2], Hisashi HEMMI[1] ([1]Grad. Sch. Bioagr. Sci. Nagoya Univ, [2]Keihanna Academy of Science and Culture)

【背景と目的】発酵熱はあまりに自明の現象のためか、その生成機構の詳細な解明はなされていない。しかし、発酵熱生成によって震災時等の瓦礫の自然発火が起こること、発酵熱生成が発酵生産の工程に冷却コストをもたらすことなど、発酵熱が問題となる場合もある。このような背景から、申請者は発酵熱の生成機構を解明しその制御方法を開発すること目指している。
【方法】発酵熱産生のモデルとして、天然インジゴ生産の過程である「すくも」作製に関わる藍葉の発酵系を用いた。大腸菌の生育に伴う発熱の測定はけいはんな文化学術協会製の非破壊微生物活性計測システム Antares R を用いて行った。藍葉発酵過程の菌叢解析には DGGE 法を用いた。
【結果と考察】「すくも」の生産現場では発酵途上の藍葉の温度が 70℃近くまで上昇することが知られているが、30℃の実験室における小規模な藍葉発酵の系では、40℃程度までの温度上昇が見られた。この発酵過程の藍葉から数種の真正細菌および真菌類が検出されたが、抗生物質存在下での藍葉の発酵、あるいは単離した菌株による無菌処理済み藍葉の発酵の解析から、藍葉発酵時の温度上昇には *Aspergillus oryzae* 近縁種を中心とする真菌が関与するものと考えられた。発酵熱生成の原因として、呼吸によって得られたエネルギーが ATP 合成と脱共役し熱として放出される可能性を想定し、*E. coli* の FoF1-ATPase の変異株を用いてこれを検討した。*E. coli* 野生株および FoF1-ATPase の変異株（*atpA* および *atpC* 株）を制限量のグルコースを含む M9 最小培地で生育させたところ、最終的な菌体生育量はグルコース濃度に依存し、変異株の生育量は野生株の 70-80％程度に留まった。一方、Antares R を用いて測定したそれぞれの菌株の生育に伴う細胞当たりの発熱量は、*atpA* 株で野生株の 2.26 倍、*atpC* 株で 2.56 倍となった。以上の結果は、ATPase 欠損 *E. coli* 株では、呼吸鎖において得たエネルギーが菌体生育に使われる効率が野生株より低く、エネルギーの一部が熱として放出される可能性を示唆した。現在 *A. oryzae* による発熱に ATP 合成の脱共役タンパク質である alternative oxidase (AOX)が関与する可能性を検討中である。

fermentation heat, Aspergillus oryzae, FoF1ATPase

発表責任者：吉村　徹（yosimura@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：4C19a02
講演日時：3 月 20 日 09:35～ C 校舎 19 会場

好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 の heterodisulfide reductase に関する研究
Study on a heterodisulfide reductase in *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6
○小倉 一将、新井 博之、石井 正治（東大農生科）
○Kazumasa OGURA, Hiroyuki ARAI, Masaharu ISHII (Univ. of Tokyo)

*Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 は伊豆の峰温泉付近の土壌から単離された好熱性絶対独立栄養性の水素細菌である。本菌はエネルギー源として水素またはチオ硫酸、唯一の炭素源として二酸化炭素を利用する。当研究室ではゲノム解析、トランスクリプトーム解析などにより、本菌における硫黄代謝の研究が行われており、本菌は元素硫黄を中間生成物としたチオ硫酸の酸化代謝を持つことが示唆されている。

本菌におけるチオ硫酸酸化は 2 つのステップに分けられる。まずチオ硫酸はペリプラズムに存在する Sox タンパク質によって、元素硫黄と硫酸イオンに酸化される。一部の元素硫黄は菌体外に放出されるが、最終的に全ての元素硫黄が細胞質側へ移行し、硫酸にまで酸化される。*H. thermophilus* はこの過程で生育するためのエネルギーを得るほか、一部の硫黄原子を同化して生体構成成分とする。

*H. thermophilus* では heterodisulfide reductase-like protein (Hdr)が菌体内外の硫黄粒子の酸化に関わると考えられている。これまでに *hdrA* 遺伝子破壊株（Δ*hdrA*)が取得され、表現型が調べられてきた。今回はチオ硫酸培養時における各種硫黄化合物の挙動の詳しい観察を中心に、Δ*hdrA* の生理学的解析を行った。

チオ硫酸をエネルギー源としてΔ*hdrA* の生育を確認したところ、野生株と比較して生育が著しく悪くなった。培養液中の各種硫黄化合物（チオ硫酸、元素硫黄、硫酸イオン)の濃度を経時的に測定したところ、死滅期においても元素硫黄の残存が見られた一方、硫酸イオン濃度は野生株と比較して低く、pH の減少も見られなかった。これらのことから、Hdr が硫黄の酸化に関わり、チオ硫酸からのエネルギー獲得に重要な役割を果たしていることが示唆された。また、Δ*hdrA* では培養が進むにつれて、総硫黄量の減少が見られたことから、系内に未知の硫黄種が存在することが示唆された。本発表では以上の知見に加え、Δ*hdrA* におけるチオ硫酸代謝の生理学、生化学的知見も合わせて報告する。

extremophile, sulfur metabolism, heterodisulfide reductase

講演番号：4C19a03
講演日時：3 月 20 日 09:50～ C 校舎 19 会場

# バクテリア巨大化スフェロプラストは、線維化を経て 2 分裂細胞に戻るか？
# Do bacterial enlarged spheroplasts become divided cells via elongation?

○高橋 沙和子、西田 洋巳（富山県大工）
○Sawako TAKAHASHI, Hiromi NISHIDA (Toyama Pref. Univ.)

【背景】一般にバクテリアのスフェロプラストは細胞分裂できない。また、高塩濃度および細胞壁合成阻害剤存在下の条件で培養した場合、細胞は巨大化する。腸内細菌科に属する *Lelliottia amnigena* のリゾチーム処理直後のスフェロプラストと 43 時間培養した巨大化スフェロプラストの網羅的 RNA マップ解析に基づく遺伝子発現比較より、巨大化によって多くの遺伝子発現が変動していることがわかった（Takahashi et al., 2016）。また、細胞壁合成阻害剤非存在下で培養した場合、細胞は線維化増殖する。さらに、電子顕微鏡により、巨大化細胞から線維化に移行している細胞の存在を確認しており、脱巨大化は線維化を経ていることが強く示唆された。

【目的】細胞壁合成阻害の解除によって、巨大化スフェロプラストは線維化を経て、2 分裂細胞へ戻ると考えている。この仮説を遺伝子発現プロファイルの比較より検証・考察することを目的とした。

【方法】次の 4 つの異なる細胞から RNA の抽出・精製を行った。*L. amnigena* の 2 分裂細胞、リゾチーム処理直後のスフェロプラスト、スフェロプラストをペニシリンを含まないマリン培地で 9 時間培養した線維化細胞、ペニシリンを含むマリン培地で 43 時間培養した巨大化スフェロプラストである。次の 10 の遺伝子発現を定量 RT-PCR によって測定し、比較した。細胞分裂に関連する *ftsA* と *ftsZ*、DNA 修復・維持に関連する *hupA*、*topA*、および *recA*、ストレス応答に関連する *clpB*、*pspA*、および *spy*、細胞表層に関連する *ompA* と *pbp1b* である。

【結果・考察】スフェロプラスト化によって、*ftsA* は有意な発現変動をしない唯一の遺伝子であった。*topA* および *pbp1b* は発現が減少し、そのほかの 7 つの遺伝子は発現が増加した。その 7 つの遺伝子の中、*ftsZ* および *clpB* は巨大化によってさらに発現が増加したが、そのほかの 5 つの遺伝子は発現が減少した（2 分裂細胞の発現パターンに近づいた）。他方、スフェロプラストの線維化によって、7 つの遺伝子の中、*hupA* のみの発現が増加したが、そのほかの 6 つの遺伝子の発現は減少した。スフェロプラスト化において発現減少した *topA* および *pbp1b* は、巨大化および線維化ともに発現増加しなかった。この結果は、巨大化と線維化では遺伝子発現プロファイルが異なっていることを示し、*ftsZ* や *clpB* の発現パターンは巨大化から線維化を経ることによって、2 分裂細胞に近づくと考えられる。

【文献】Takahashi et al. (2016) Comparison of transcriptomes of enlarged spheroplasts of *Erythrobacter litoralis* and *Lelliottia amnigena*. AIMS Microbiology 2, 152-189

spheroplast, enlarged cell, de-enlargement

講演番号：4C19a04
講演日時：3 月 20 日 10:05～ C 校舎 19 会場

好気性紅色光合成細菌スフェロプラスト巨大化における呼吸と光合成の影響
Effects of respiration and photosynthesis on spheroplasts of the aerobic photosynthetic purple bacterium.
○西野 弘起、中澤 舞、西田 洋巳（富山県大）
○Koki NISHINO, Mai NAKAZAWA, Hiromi NISHIDA (Toyama Pref. Univ.)

【背景】一般にバクテリアのスフェロプラストは細胞分裂できない。また、高塩濃度および細胞壁合成阻害剤存在下の条件で培養した場合、細胞は巨大化する。好気性紅色光合成細菌 *Erythrobacter litoralis* は通常の 2 分裂細胞では、有酸素下で光合成を行い、無酸素下では光合成をしない。本バクテリアのスフェロプラスト培養では、連続光照射によって、有酸素下で巨大化が阻害された（Takayanagi et al., 2016）。
【目的】*E. litoralis* のスフェロプラスト培養において、酸素の有無、暗期の有無、光の種類を考慮し、スフェロプラストにおける光合成と呼吸の関連について明らかにすることを目的とした。
【方法】*E. litoralis* のスフェロプラストを、ペニシリンを加えたマリン培地で 144 時間まで培養し、その細胞のサイズを測定した。有酸素、無酸素の 2 条件；連続明期、12 時間明期・12 時間暗期（明暗期）、連続暗期の 3 条件；明暗期においては、白色光に加え、赤色、緑色、青色の 3 つの異なる光照射を行った。
【結果】酸素の有無にかかわらず、連続明期はスフェロプラストの巨大化を阻害した。また、連続暗期の条件では、酸素がない場合、巨大化は生じず、酸素があれば、巨大化した。このことは、呼吸によって巨大化することを示す。明暗期の条件では、酸素がない場合においても、巨大化が生じ、無酸素下で光合成をしていることを強く示唆した。2 分裂細胞では無酸素下で光合成しないことより、スフェロプラスト成長に特異的な現象の可能性がある。また、赤色が白色光と同様の巨大化状態になり、緑色はそれに比べ若干劣るが、巨大化したのに対し、青色光では、巨大化を阻害した。このことは、スフェロプラストの巨大化において、異なる光波長が受容体によって識別されていることを示し、光合成が機能していることを示す結果と考えている。本実験において、最も効率よく巨大化が進行した条件は、有酸素下の暗期条件であり、有酸素下の明暗期条件よりよかった。このことは、スフェロプラスト成長において、酸素呼吸と光合成が相加的に機能していないことを強く示唆している。
【文献】**Takayanagi et al.** (2016) Requirement of dark culture condition for enlargement of spheroplasts of the aerobic anoxygenic photosynthetic marine bacterium *Erythrobacter litoralis*. J. Gen. Appl. Microbiol. 62, 14-17. **Nakazawa and Nishida** (in press) Effects of light and oxygen on the enlargement of *Erythrobacter litoralis* spheroplasts. J. Gen. Appl. Microbiol. **Nishino and Nishida** (in press) Blue light inhibits the enlargement of *Erythrobacter litoralis* spheroplasts. J. Gen. Appl. Microbiol.

respiration and photosynthesis, *Erythrobacter litoralis*, enlarged spheroplast

講演番号：4C19a05
講演日時：3 月 20 日 10:20～ C 校舎 19 会場

*Methylobacterium* 属細菌は植物葉上でパントテン酸を獲得する
Acquirement of pantothenic acid by *Methylobacterium* sp. on plant leaves
○吉田 裕介、由里本 博也、阪井 康能（京大院農）
○Yusuke YOSHIDA, Hiroya YURIMOTO, Yashuyoshi SAKAI (Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【緒言】メタノールを唯一の炭素源およびエネルギー源として生育でき、pink-pigmented facultative methylotroph (PPFM) とも呼ばれる *Methylobacterium* 属細菌は植物の葉上微生物の優占種で、中には植物に対して生長促進効果を発揮する菌株も報告されている。この菌の生長促進や共生のメカニズムは不明であり、その解明は新しい農作物増産技術の開発および自然界における植物－微生物相互作用のさらなる理解につながると期待される。植物表層に棲息する PPFM は、植物上で取得できる限られた化合物を利用して生育していると考えられる。PPFM の培養ではビタミン B 群を添加することがあるが、植物表層の PPFM におけるビタミン B 群の要求性および植物上でのやり取りについては明らかとなっていない。当研究室で植物試料より単離した複数の PPFM について種々のビタミン B 類の要求性を調べたところ、約 3 割の株がパントテン酸 ($B_5$) を必要することを前回報告した [1)]。本研究ではパントテン酸要求性 PPFM について、生育に必要な栄養素をより詳細に解析し、植物葉上での栄養素のやり取りを明らかにすることを目的とした。

【実験方法および結果】パントテン酸要求性 PPFM がパントテン酸生合成に必要な 2 つの前駆体、(*R*)-パントイン酸と β-アラニンのどちらを合成できないかを明らかにするために培地への添加実験を行ったところ、β-アラニンを加えた場合にパントテン酸添加の場合と同程度の生育が認められた。すなわち PPFM のパントテン酸要求性は β-アラニンを合成できないことに由来することが明らかになった。続いて、パントテン酸要求性 PPFM が植物葉上で生育可能かを調べるために、*A. thaliana* の種子に接種し 2 週間生育させたあとの葉上での生育菌数を測定したところ、葉 1 枚あたり約 $10^5$ cell の PPFM が存在していた。そして、無菌状態で生育した *A. thaliana* の葉を 20 枚回収し、滅菌水 1mL に浸して 15 分間超音波処理したあと、この水溶液中に存在するパントテン酸および β-アラニンの量を微生物定量法および HPLC-MS/MS を用いて測定したところ、葉 1 枚あたりそれぞれ 8.0 pmol、20.8 pmol 検出された。これらの結果より、植物表層の PPFM は、パントテン酸を生育に必要とする株であっても、植物からパントテン酸または β-アラニンを得て生育することができることが示唆された。

1)吉田ら、日本農芸化学会 2016 年度大会、2F034

*Methylobacterium* sp., Pantothenic acid, Plant-microbe interaction

発表責任者：吉田裕介（yoshida8@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4C19a06
講演日時：3 月 20 日 10:35～ C 校舎 19 会場

担子菌ヒトヨタケおよびヒラタケにおける pex1 破壊株の表現型の共通点と相違点
Comparison of phenotypes of *pex1* disruptants between two agaricomycetes, *Coprinopsis cinerea* and *Pleurotus ostreatus*
○中沢 威人、本田 与一 (京大農)
○Takehito Nakazawa, Yoichi Honda (Kyoto Univ.)

ゲノム情報に基づいた分子時計解析の結果、担子菌類の進化過程における木材腐朽能力の獲得、変化および脱落に関する詳細な時系列が提唱された。例えば、腐生菌ヒトヨタケ(*Coprinopsis cinerea*)と白色腐朽菌ヒラタケ(*Pleurotus ostreatus*)は、共通の祖先（白色腐朽菌）から分岐した、進化上比較的近い種だと考えられる。分岐後、遅くとも 2000 万年までに、ヒトヨタケは木材腐朽菌から腐生菌へと進化したと考えられる（Kohler *et al.* 2015. Nat. Genet.)。一方、発表者らは、ヒラタケを用いた順遺伝学研究を行い、リグニン生分解能力を低下させる原因変異遺伝子を特定したことを報告した（Nakazawa *et al.* Environ. Microbiol. in press)。最近、新たな変異原因遺伝子として、真核生物でペルオキシソーム形成に関わる AAA ファミリーATPase をコードする *Po. pex1* 遺伝子を同定した。*Po. pex1* 破壊株では、ブナ木粉培地（小麦ふすま添加）中のリグニン生分解能力が著しく低下し、同時に子実体が発生しなくなる。さらに他の真核微生物と同様、*Popex1* 破壊は、グルコースをオレイン酸に変更した最少培地（C 源になりうる化合物として、他にアスパラギン酸が含まれる）上での生育速度を著しく低下させた。(Nakazawa *et al.* 投稿準備中)。本発表では、上記の研究知見に基づいて、ヒトヨタケにおいて *Cc. pex1* 破壊株の表現型を調査し、ヒラタケの場合（*Po. pex1* 破壊株）と比較した。*Cc. pex1* 破壊株は、キノコ発生開始不全の表現型を示した。この点に関しては、*Po. pex1* 破壊株と一致する表現型であった。一方で、*Cc. pex1* 破壊株では酵素活性(ABTS を基質とするラッカーゼおよびペルオキシダーゼ活性）に関して、野生株(ku3-24)と比較して顕著な差を生じなかったことに加え、グルコースをオレイン酸に変更した最少培地における生育速度も、野生株と *Cc. pex1* 破壊株との間で差はなかった。これらの点に関しては、*Po. pex1* 破壊株とは異なる結果であった。以上からは、Pex1（およびペルオキシソーム）が関わる、子実体発生開始に必須な分子機構は保存されていると考えられるが、炭素代謝がヒラタケとヒトヨタケの間で異なることが示された。このことからは、ヒラタケ（および、ヒラタケとヒトヨタケの共通祖先にあたる白色腐朽菌）では、木質中の成分（糖およびリグニン）を資化することに特化した代謝であったのに対して、腐生菌ヒトヨタケへの進化に伴って土壌中の死骸および排泄物に含まれる成分（糖・リグニン以外の炭素源）を、効率よく自身の栄養へと変換し、生育できる代謝系へと変遷していった可能性が示唆された。現在、この可能性を検証するため、最少培地中の C 源および N 源を様々に変更した場合の、ヒトヨタケおよびヒラタケ（および *pex1* 破壊株）の生育に及ぼす影響を調査中である。

basidiomycete, peroxisome, fruiting

講演番号：4C20a01
講演日時：3 月 20 日 09:20～ C 校舎 20 会場

# PCB/ビフェニル分解菌 Alcaligenes denitrificans A41 株のポリヒドロキシアルカン酸（PHA）合成関連遺伝子の解析

# Analysis of the PHA production related genes in a PCB/biphenyl degrading bacterium, Alcaligenes denitrificans A41

○永友 瑞希、前田 理久（明治大学大学院農学研究科）
○Mizuki Nagatomo, Michihisa Maeda (Meiji Univ.)

*Alcaligenes denitrificans* A41 株(以下、A41 株)は、PCB/ビフェニル分解能およびポリヒドロキシアルカン酸(以下、PHA)合成能をもち、環境汚染物質から有用物質生産のための微生物システムのプラットフォームとして優れている。A41 株はビフェニルを単一炭素源として PHA を生産することができる。われわれは、この PHA 生産性を最適化するために、PHA 生産に関わる代謝系を解析している。今回は、中心的な役割を果たす PHA シンターゼ遺伝子 *phaC* およびモノマー単位合成に関わる *phaA* について解析したので報告する。

A41 株のゲノムには *phaC* ホモログが 2 個存在する。60 種の異なる PhaC と系統樹を作製したところ、４つの既知クラスと１つの未知クラスに分類された。既知クラスの中で更に分類したところ、$PhaC1_{A41}$ は *Ralstonia eutropha* H16 株(以下、H16 株)に関連したクラスに、$PhaC2_{A41}$ は未知のクラスに分類された。そのうち、H16 株の主要な *phaC* 遺伝子(*phaC*$_{H16}$)により高い同一性(56.7%)を示す *phaC1*$_{A41}$ 遺伝子について、ゲノム情報にしたがってプライマーを作成してクローニングし、破壊株を作製した。数種の単一炭素源で培養し、PHA 生産を行った結果、いずれの条件でも PHA 蓄積が見られなかった。このことから、A41 株の主要な *phaC* 遺伝子であることが明らかになった。

次に、PHA のモノマー供給に関わるアセチル CoA アセチルトランスフェラーゼ遺伝子 *phaA* について解析した。A41 株のゲノムを *phaA* 遺伝子ホモログが 3 個存在し、バイオインフォマティクスにより、本酵素をコードする可能性が高いものから *phaA1*、*phaA2*、*phaA3* と名付けた。系統解析から、PhaA2、PhaA3 は $PhaA_{H16}$ に関連し、その中でも PhaA3 は scl-PHA 生産菌の PhaA に近いことが明らかになった。そこで、この *phaA3* 遺伝子の PHA 生産に対する寄与を推測するために、その破壊株を作製し、数種の炭素源で PHA 生産を行った。コハク酸単一炭素源の場合、野生株より生産速度が有意に減少したが、最大蓄積量、モノマー組成比には大きな差は見られなかった。等量のコハク酸およびプロピオン酸を炭素源とした場合、PHA 生産特性に大きな差異が見られた。野生株よりも培養経過時間が短いうちから著量の蓄積量を示し、3-ヒドロキシ吉草酸モノマー(C5 モノマー)組成が減少した。このことは、*phaA3* 遺伝子産物の欠損によって代謝経路に影響が及ぼされ、細胞内の PHA 関連代謝物の組成がシフトしたことを意味しており、*phaA3* 遺伝子産物の細胞内での役割が推測された。残りの *phaA* 遺伝子の役割も含めて解析を進めている。

polyhydroxyalkanoate, PCB/biphenyl, PHA synthase

講演番号：4C20a02
講演日時：3 月 20 日 09:35～ C 校舎 20 会場

ビフェニル/PCB 分解性 *Pseudomonas* 細菌の *bph-sal* element 上にコードされるサリチル酸および安息香酸分解系遺伝子のクローニングおよび機能解析

Cloning and functional analysis of salicylate and benzoate catabolic genes encoded on the *bph-sal* element of biphenyl/PCB degrading *Pseudomonas*

○廣瀬 遵[1]、米村 凌[1]、横井 春比古[1]、末永 光[2]、木村 信忠[3]、渡邊 崇人[4]、二神 泰基[5]、後藤 正利[6]、藤原 秀彦[7]、古川 謙介[7] ([1]宮崎大工・環境応用化、[2]産総研・創薬基盤、[3]産総研・生物プロセス、[4]京大・生存研、[5]鹿大・農、[6]佐賀大・農、[7]別府大・食物栄養)

○ Jun HIROSE[1], Ryo YONEMURA[1], Haruhiko YOKOI[1], Hikaru SUENAGA[2], Nobutada KIMURA[3], Takahito WATANABE[4], Taiki FUTAGAMI[5], Masatoshi GOTO[6], Hidehiko FUJIHARA[7], Kensuke FURUKAWA[7] ([1]Faculty Eng. Univ. Miyazaki, [2]Biotechnol. Res. Inst. Drug Discovery AIST, [3]Bioproduction Res. Inst. AIST, [4]RISH Kyoto Univ, [5]Faculty Agric. Kagoshima Univ., [6]Faculty Agric. Saga Univ., [7]Dept. Food Nutri. Beppu Univ.)

【目的】ビフェニル/PCB 分解性 *Pseudomonas* 属細菌のゲノミックアイランドである *bph-sal* element 上で、ビフェニル代謝系 *bph* オペロンの近傍に存在する *sal* 遺伝子群と *bza* 遺伝子群は既知のサリチル酸分解経路ならびに安息香酸分解経路をそれぞれコードしている遺伝子群と高い相同性を示しており、それに基づいて *sal* 遺伝子群と *bza* 遺伝子群の各コンポーネントにコードされる遺伝子産物が同定されている(Fig. 1)。*bph-sal* element 上で、*sal* 遺伝子と *bza* 遺伝子にコードされる 2 つの芳香族カルボン酸代謝経路は、ビフェニルの下流代謝経路として機能していると考えられているが、それらの機能の詳細は未確認のままである。一方、*bph*、*sal*、*bza* 遺伝子の大部分は、起源が同一の相同遺伝子であることから、*bph-sal* element 上で重複してコードされているこれらのメタ開裂分解系遺伝子群は、細菌の芳香環代謝経路の起源および進化について新たな知見を与えるものと考えられる。本講演では、*P. pseudoalcaligenes* KF707 由来の *sal* 遺伝子および *bza* 遺伝子群のクローニングならびに同遺伝子群を発現している組換え大腸菌の物質代謝機能について調べた結果について報告する。

【方法および結果】*sal* 遺伝子群ならびに *bza* 遺伝子群の転写制御因子と安息香酸トランスポーター遺伝子を除く領域をそれぞれ PCR で増幅し、クローニングを行った。*salA* から *salE* 遺伝子までの 5.5 kb のクローン、または *bzaA* から *bzaD* 遺伝子までの 7.0kb のクローンを保有している組換え大腸菌はサリチル酸、安息香酸に対する分解活性をそれぞれ示し、メタ環開裂化合物であるヒドロキシムコン酸(HMA)を蓄積した。一方、*salA* から *salJ* 遺伝子までの 9.5kb の領域、または *bzaA* から *bzaJ* 遺伝子までの 10.5kb の領域を保有する大腸菌は、サリチル酸、安息香酸をそれぞれ完全に分解し、反応系から Fig. 1 に示される代謝中間体はほとんど検出されなかった。以上の結果から、*sal* 遺伝子群ならびに *bza* 遺伝子群にコードされる代謝酵素群はそれぞれサリチル酸と安息香酸に対する分解活性を示すことが確認できた。

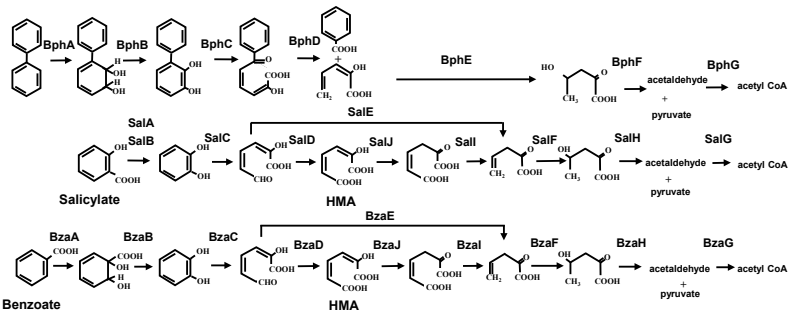



Fig.1 *P. pseudoalcaligenes* KF707 のビフェニル、サリチル酸、安息香酸代謝経路

*bph-sal* element, *Pseudomonas*, genomic island

講演番号：4C20a03
講演日時：3 月 20 日 09:50～ C 校舎 20 会場

ビフェニル/PCB 分解能力を高頻度に転移・欠失する *Pseudomonas putida* KF715 株のゲノム構造の柔軟性

Insight into genome plasticity of biphenyl-utilizing *Pseudomonas putida* KF715

○末永 光[1]、藤原 秀彦[2]、木村 信忠[3]、廣瀬 遵[4]、渡邊 崇人[5]、二神 泰基[6]、後藤 正利[7]、古川 謙介[2] ([1]産総研・創薬基盤、[2]別府大・食物、[3]産総研・生物プロセス、[4]宮崎大・工、[5]京大・生存研、[6]鹿児島大・農、[7]佐賀大・農)

○Hikaru SUENAGA[1], Hidehiko FUJIHARA[2], Nobutada KIMURA[3], Jun HIROSE[4], Takahito WATANABE[5], Taiki FUTAGAMI[6], Masatoshi GOTO[7], Kensuke FURUKAWA[2] ([1]AIST Drug Discovery, [2]Beppu Univ., [3]AIST Bioproduction, [4]Miyazaki Univ., [5]Kyoto Univ., [6]Kagoshima Univ., [7]Saga Univ.)

【目的】

*Pseudomonas putida* KF715 株は、ビフェニル/PCB 代謝に関わる遺伝子群（*bph*）、サリチル酸代謝に関わる遺伝子群（*sal*）を有しているが、その形質は非常に不安定である。これまでの研究により、本菌株は接合伝達により他菌株に *bph/sal* 遺伝子群（*bph-sal* element）を高頻度に供与する能力を有していること、さらに、栄養培地で培養すると容易にビフェニル／サリチル酸分解能が消失した株が出現することを明らかにしている。これらの現象は KF715 株のゲノム構造の柔軟性に起因するものであり、パルスフィールドゲル電気泳動の結果、*bph-sal* element のみの欠失や転移にとどまらないダイナミックなゲノム構造の再編成の生起が確認されている。本研究では、これらの表現型の変遷をゲノム構造から明らかにするために、はじめに KF715 野生株の完全長ゲノム配列を決定し、次いで *bph-sal* element の欠失株（KF715Bph$^-$）および *bph-sal* element が *P. putida* AC30 株(Bph$^-$)に転移した株（AC30Bph$^+$）、さらに *P. putida* KT2440 株(Bph$^-$)に転移した株（KT2440Bph$^+$）について比較ゲノム解析を行った。次に、KF715 株が持つゲノム柔軟性の遺伝的要因を解明するために、安定なゲノム構造を持つ *P. putida* 菌株群との比較ゲノム解析を行った。

【結果】

ゲノム配列解析の結果、KF715 株は 1 つの環状染色体と 4 つのプラスミド（pKF715A, pKF715B, pKF715C, pKF715D）を有し、*bph-sal* element は pKF715A 上に存在していることが明らかとなった。周辺領域の遺伝子配列とサザンハイブリダイゼーションの結果より、pKF715A は Integrative and Conjugative Element (ICE)の環状中間体がプラスミドとして安定に存在しているものであり、一方で *att*B 部位を標的にして pKF715A が再び染色体上に組み込まれている個体も混在していた。また、pKF715A は接合伝達により AC30 株、さらに KT2440 株に転移した後も、染色体上に組み込まれることなく安定にプラスミドとして存在し、典型的な ICE とは異なる挙動を示した。続いて全ゲノム配列が決定されている他の *P. putida* 株と配列を比較したした結果、KF715 株に特徴的な遺伝子群が確認され、これらの遺伝因子が KF715 株の柔軟なゲノム構造に寄与していることが推察される。

genome, Pseudomonas putida, biphenyl

発表責任者：末永光（suenaga-hikaru@aist.go.jp）

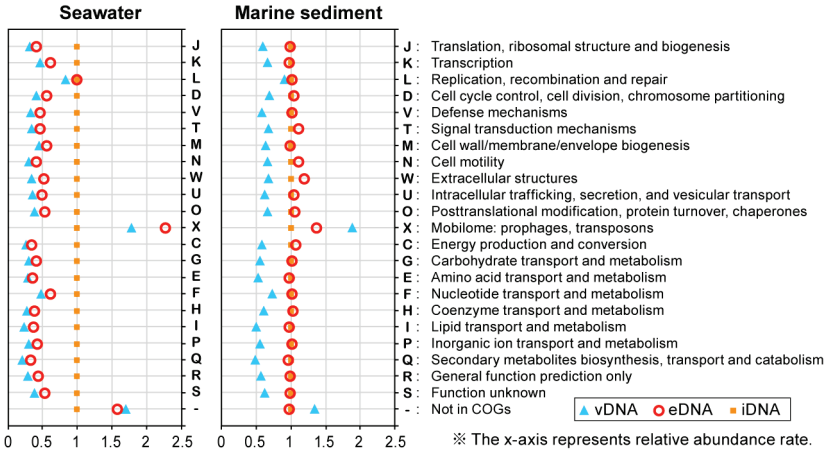
講演番号：4C20a04
講演日時：3 月 20 日 10:05～ C 校舎 20 会場

# 海水と海底堆積物の細胞外 DNA における可動性遺伝因子の濃縮

# Concentration of mobile genetic elements in extracellular DNA in seawater and marine sediment

○高橋 裕里香[1]、宮西 謙弥[1]、中野 椋太[1]、畠 俊郎[2]、西田 洋巳[1] ([1]富山県大生工科・生工セ、[2]富山県大環工科)
○ Yurika TAKAHASHI[1], Kenya MIYANISHI[1], Ryota NAKANO[1], Toshiro HATA[2], Hiromi NISHIDA[1] ([1]Dept. of Biotech. and Biotech. Res. Center, Toyama Pref. Univ., [2]Dept. of Environ. Eng., Toyama Pref. Univ.)

【背景・目的】環境中では、細胞外に放出された DNA 分子は全てが速やかに分解されるわけではなく、細胞内と同等あるいはそれ以上の DNA が細胞外に存在する環境もある。遺伝子の水平伝播様式としては、ウィルス、プラスミド、トランスポゾン等の可動性遺伝因子が大きな役割を担っているが、こうした細胞外 DNA (eDNA)による自然形質転換の寄与も無視できないと推測される。これまでに我々は、富山湾の海水及び海底堆積物から細胞外 DNA を分離して塩基配列決定を行い、GC 含量や連続塩基出現頻度の解析、クラスタリング解析、16S アンプリコン解析によって、海水中の eDNA はウィルス粒子内 DNA(vDNA)に近い配列であり流動性が高い(地点間の差異が少ない)こと、一方で、海底堆積物中の eDNA は細胞内 DNA(iDNA)に近い配列であり流動性が低い(地点ごとに菌叢に応じた組成を示す)ことを報告している（高橋ら, 昨年度本大会 ; 宮西ら, 昨年度本大会 ; 中野ら,昨年度本大会)。今年度は eDNA 中の遺伝子の特徴を解析し、iDNA, vDNA との異同を明らかにすることを目的とした。
【結果・考察】*de novo* アセンブルにより得られたコンティグ配列上で遺伝子予測を行い、COG (Clusters of Orthologous Groups of proteins) に基づいて機能分類した（下図)。存在割合（各カテゴリーに分類される遺伝子の数/予測された遺伝子の総数）はほとんどのカテゴリーで vDNA＜eDNA＜iDNA となっており、さらにその比率がカテゴリー間でほぼ一定であった。このことから、eDNA の主成分は同地点の iDNA と vDNA がある割合で混合されたものであり、海水中では vDNA を、海底堆積物中では iDNA をそれぞれ多く含んでいることが改めて示された。ただし例外として mobilome (可動性遺伝因子)カテゴリーに含まれる遺伝子については、eDNA 中の存在割合が iDNA と vDNA のいずれよりも高い値を示す地点が複数あり、可動性遺伝因子が細胞外で濃縮されていることが強く示唆された。プラスミドについては、153 種類の既知のプラスミド複製開始タンパク質(Rep)のアミノ酸配列全長に対する相同性検索も行い、細胞内と細胞外の両方に検出される種類と、細胞外に多く検出される種類をそれぞれ明らかにした。




extracellular DNA, mobile genetic elements (MGEs), seawater and marine sediment

講演番号：4C20a05
講演日時：3 月 20 日 10:20～ C 校舎 20 会場

プラスミドを持つ宿主の fitness（適応度）を増加させる原因因子の同定
Pseudomonas putida PpY101 has factor(s) reliving 'burden' on the host cells by carriage of a plasmid
○LE THI THANH THU[1]、片岡 大亮[1]、道羅 英夫[2]、金原 和秀[3]、新谷 政己[3]（[1]静大院、[2]静大、グリーン研、[3]静大工、静大院、静大創造院）
○Thi Thanh Thu Le[1], Taisuke Kataoka[1], Hideo Dora[2], Kazuhide Kimbara[3], Masaki Shintani[3]（[1]Shizuoka Univ., [2]Shizuoka Univ. RIGST, [3]Shizuoka Univ,）

【目的】プラスミドは微生物間を接合伝達により伝播し，微生物はプラスミドを得ることで，世代を経ずに新たな形質を獲得し，環境変化にも素早く適応する．一方，宿主はプラスミドを維持するためにエネルギーが必要なため，プラスミドをもつことが宿主に有利でない環境条件下では，プラスミドをもたない場合に比べて生育が悪くなる．これを宿主の適応度（fitness）が低下するという．プラスミドによる宿主の fitness の変化は，プラスミドをもつ菌株ともたない菌株とを競合培養し，どちらの菌株が優占化するかによって評価する．プラスミドと宿主の fitness の関係を調べることは，微生物の進化・適応能の理解につながるばかりでなく，優れたプラスミドベクターを作製する上でも重要である．昨年度本大会にて，*Pseudomonas putida* mt-2 株に由来する 2 種類の派生株，KT2440 株及び PpY101 株を IncP-1 群に属するプラスミド pBP136，または IncP-7 群に属するプラスミド pCAR1 の宿主としたところ，KT2440 株はいずれのプラスミドをもつ場合にも fitness が低下したのに対し，PpY101 株では上昇した．従って，PpY101 株にはプラスミドをもつ際に fitness を増加させる因子が存在すると推定された．本年度は，各菌株の全ゲノム配列を比較し，この因子を探ることとした．
【方法】KT2440 株と PpY101 株の全 DNA を抽出後， MiSeq（Illumina 社）にてショットガンゲノムシーケンスを実施し，各菌株のドラフトゲノムシーケンスを得た．得られた配列と，既存の参照配列（Nelson et al., 2002, Environ. Microbiol. 4:799）との比較を，large-scale blast score ratio（LS-BSR）によって行い，各菌株間における遺伝子領域の欠損の有無について調べた．PpY101 株で欠落が認められた領域を，人為的に欠落させた KT2440 株の欠損変異株を作出し，pBP136 または pCAR1 保持株と非保持株についての競合試験を行った．
【結果と考察】2 菌株のゲノム配列を LS-BSR によって比較し，PCR により検証したところ，PpY101 株は，KT2440 株の外来性の遺伝子領域と推定される GI-50 (genomic island-50) 領域の一部，約 56 kb を相同組換えによって欠損していることが示唆された．そこで，KT2440 株から当該領域を除いた欠損株 KT2440ΔGI50 株を作出し，pBP136 または pCAR1 を伝達させて，プラスミド保持株と非保持株とで競合試験を行った．その結果，プラスミドを保持する KT2440ΔGI50 株は，KT2440 株に比べて fitness の低下が部分的に解消された．この結果から，本領域にプラスミドの宿主の fitness を低下させる因子が存在することが示唆された．現在は，PpY101 株で欠落が認められた他の領域についても欠損変異株を作製し，fitness の変化に違いが生じるかどうか調べている．

plasmid, host, fitness

発表責任者：新谷政己（shintani.masaki@shizuoka.ac.jp）

講演番号：4C20a06
講演日時：3 月 20 日 10:35～ C 校舎 20 会場

ヤナギマツタケ（*Agrocybe cylindracea*）の子実体で高発現するタンパク質の遺伝子解析
Gene analysis of a protein specifically expressed in the fruiting body of *Agrocybe cylindracea*
○橋本 みつき[1]、廣岡 侑磨[1]、岩田 眞人[2]、松元 俊彦[1]、安藤 祥司[1] ([1]崇城大生物生命、[2]アイエムビー)
○Mitsuki HASHIMOTO[1], Yuma HIROOKA[1], Makoto IWATA[2], Toshihiko MATSUMOTO[1], Shoji ANDO[1] ([1]Sojo Univ., [2]IMB corp.)

【目的】食用キノコは機能性食品として生活習慣病の予防などが期待されている。しかし、菌糸から子実体（いわゆる傘状のキノコ）を形成する分子基盤については不明な点が多い。また、人工栽培によって子実体形成が可能なものと、そうでないものがある。今回、ヤナギマツタケ（*Agr. cylindracea*）のプロテオーム解析を行い、菌糸に比べて子実体で発現量が上がるタンパク質の遺伝子解析を行ったので報告する。
【方法・結果】福岡産 *Agr. cylindracea* の菌糸、子実体の柄と傘から、urea/thioure を含む抽出液でタンパク質を抽出した。タンパク質を蛍光標識後、二次元電気泳動を行い、菌糸に比べて子実体の柄と傘でタンパク質の量が上がるスポットを複数見出した。各スポットについて質量解析を行い、そのうちの一つがデータベース検索の結果、フランス産ヤナギマツタケ *Agr. aegerita* の *Pri4* 遺伝子産物と類似することが示された。この遺伝子は子実体形成初期に mRNA の発現量が上がることが報告されていたが、その機能などは不明である。

そこで *Agr. cylindracea* の子実体の柄から RNA を抽出し、一本鎖 cDNA 合成に続いて種々のプライマーを用いた PCR を行った結果、約 550bp の cDNA を得た。これをクローニングし、塩基配列を解析した結果、全長 351bp のコード領域を含むことが示された。その塩基配列は、フランス産 *Agr. aegerita* 由来の *PRi4* とは 77%の相同性を有していた。また、部分塩基配列が報告されていた中国産 *Agr. aegerita* 由来の *PRi4* とは 98%の相同性、タイ産 *Agr. chaxingu* 由来の *PRi4* とは 100%一致した。予想されるアミノ酸配列は、他の *Pri4* との比較から、保存性の高い領域を一部にもち、リン酸化可能な部位を複数もつことが示された。

次に、クローニングした cDNA を鋳型にして、DIG 標識したアンチセンスおよびセンス RNA プローブを合成し、*Agr. cylindracea* の菌糸、子実体の柄と傘についてノーザンブロッティング解析を行った。その結果、菌糸や傘よりも、柄で特徴的に mRNA が発現していることが示された。現在、その発現部位をさらに詳しく解析中である。

Basidiomycota, Fruiting body formation, Gene expression

発表責任者：安藤祥司（andosho@bio.sojo-u.ac.jp）

講演番号：4C20a07
講演日時：3 月 20 日 11:00～ C 校舎 20 会場

# 微生物叢解析における DNA 抽出方法の影響　～土壌と糞便を例に～

# Evaluation of DNA extraction methods on environmental and fecal microbiota by 16S rRNA gene amplicon sequencing

○三浦 隆匡、平方 里美、山副 敦司、川﨑 浩子（（独）製品評価技術基盤機構　バイオテクノロジーセンター)
○Takamasa MIURA, Satomi HIRAKATA, Atsushi YAMAZOE, Hiroko KAWASAKI (NITE, NBRC)

【背景と目的】近年、マイクロバイオーム研究をはじめとする微生物群集解析において、新型シーケンサーを用いた 16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンスが有力な手法として用いられている。本方法は、複数の微生物によって構成されている試料から直接 DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子をユニーバーサルプライマー用いて PCR 増幅し、網羅的に塩基配列を決定する。微生物種毎に特有の塩基配列を有していることから、多変量解析等を行い、微生物組成や群集構造を解析することができる。しかし、微生物毎に細胞構造が異なることに起因して、試料から直接 DNA を抽出する際、DNA 抽出効率が異なり、解析結果に影響を及ぼすことも指摘されている。そこで、本研究では、物理的破砕方法と化学的溶菌方法に注目し、市販の各種 DNA 抽出キットを用い、土壌・水サンプル等の環境由来サンプルと糞便サンプルについて、群集構造解析の結果に及ぼす影響について検討を行った。
【方法】物理的破砕方式の 4 キットと化学的溶菌方式の 2 キットを用いて、DNA 抽出効率を検討した。微生物群集構造解析は、16S rRNA 遺伝子の V3,4 領域（Bakt341F, Bakt805R）を PCR 増幅し、MiSeq を用いてアンプリコンシーケンスを行った。解析には QIIME パイプラインを用いた。
【結果と考察】**(1)** DNA の抽出効率と精製度：物理的破砕法は化学的溶菌法と比較し、すべてのサンプルにおいて DNA 抽出量が多いという結果が得られた。群集解析の結果、物理的破砕法では *Actinomyces* 門の割合が高いという結果からも、前者は硬い細胞壁などを有する微生物も破壊できる一方で、後者はそのような微生物を溶菌することが難しいことに起因していると推測された。精製度は抽出方法に影響を受けやすいと考えられた。
**(2)** 微生物群集構造：shannon 指数や chao1 指数などの α-多様性は、化学的溶菌で低くなる傾向にあった。β-多様性において、weighted UniFrac 解析では、ほとんどのサンプルにおいて物理的破砕法によって得られた群集と化学的溶菌法によって得られた群集が分かれる結果となった。なお、物理的破砕法において DNA 抽出量が少なかった群集は、化学的溶菌による群集と類似するという結果であった。Unweighted UniFrac 解析では、DNA 抽出量が少なかった環境サンプルを除き、サンプルごとにクラスタリングされた。
以上のことから、微生物群集解析において、DNA の抽出量と精製度が重要な要因であることが明らかとなった。また、物理的破砕方法はおおむね効率よく DNA 抽出ができるが、破砕後の DNA 精製方法をサンプルごとに検討する必要があることが示された。

DNA extraction, Amplicon sequence, microbiome

講演番号：4C20a08
講演日時：3 月 20 日 11:15～ C 校舎 20 会場

# 最確数・制限酵素多型断片長解析による環境中の硫酸還元菌群集の同定・定量条件の検討

# Optimization of MPN/MERFLP Method for Identification and Quantification of Sulfate Reducing Bacterial Group in Environment

○渡辺 克二、松本 邦成（福工大工）
○Katsuji Watanabe, Kunimasa Matsumoto (FIT)

[背景・目的]

嫌気性微生物は、様々な嫌気環境中に広く分布し物質循環を担っており、嫌気性微生物の有効利用技術の確立は嫌気性廃棄物処理、有毒ガスの発生抑制や汚染環境修復技術を効率的に行うため必要とされている。一方で、好気性微生物と比較して嫌気性微生物の解析には多大な労力が必要となり、様々な環境中の嫌気性微生物の実態を解明するには嫌気性微生物を簡便に解析する方法の確立が必要となる。我々はこれまでに好気性微生物群集の同定・定量が最確数・制限酵素断片長多型解析法を用いて簡便に可能なことを見出だしてきた。ここでは、この方法を嫌気性微生物相叢の迅速・簡便な解析方法として用いるため、環境中（畜産排水処理施設の活性汚泥中）の硫酸還元菌(SRB)を対象として種々の条件検討を行った。

[方法]

DNA 抽出方法の検討：リゾチーム SDS 法と機械的破砕法による MPN 法による計数結果を比較した。培養中の酸素濃度の検討：同一ｻﾝﾌﾟﾙを偏性嫌気性条件下、通性嫌気性条件下、好気性条件下で培養し硫酸還元菌が選択的に増殖されるかどうか調べた。PCR プライマーの検討：同じ領域を増幅する異なるプライマーとこれらの組み合わせで(41f/1066r、41mf/1066mr、41f・41mf/1066r・1066mr)増幅されてくる硫酸還元菌叢にどのような違いが生じるか検討した。

[結果]

DNA 抽出方法の検討：両抽出法の計数値の間に大きな差は生じなかった。培養中の酸素濃度の検討：偏性嫌気性条件下で硫酸還元菌の検出割合(46.7%)、硫酸還元菌数（$7x10^6$MPN）が最高となった。一方、好気性条件下では硫酸還元菌の検出割合(0.47%)、硫酸還元菌数（$7x10^3$MPN）は最低となった。偏性嫌気性条件下と通性嫌気性条件下では、硫酸還元菌叢と数に差があり、培養時の嫌気性の違いによって優先的に増殖される菌が代わると考えられた。PCR プライマーの検討：41f/1066r プライマーを使用した場合は、*Desulfohalobium* 属，*Desulfovibrio* 属，*Desulfotomaculum* 属が検出され、41mf/1066mr を使用した場合は、*Desulfomicrobium* 属,*Desulfovibrio* 属が検出されている。このことから、プライマーを使い分けることで、含まれている菌叢を広く検出出来ることが判明した。プライマーを同時に使用した場合は、両方で検出される *Desulfovibrio* 属が主に増幅された為、混合プライマーを使用しても一度に広範囲の硫酸還元菌群を捕まえることはできなかった。最確数法による計数結果からは、41mf/1066mr プライマーを使用した際に、硫酸還元菌数が最大になり硫酸還元菌のみが選択的に検出された。

Identification, Quantification, Sulfate Reducing Bacterial Group

講演番号：4C20a09
講演日時：3 月 20 日 11:30～ C 校舎 20 会場

# 耐熱性メタゲノムライブラリーの構築とカタラーゼ遺伝子の探索

# Construction of metagenome library from hot spring soil and search for catalase gene from them

○奥村 史朗[1]、片山 秀樹[1]、山下 聡子[1]、仲山 真美[2]、冨岡 寛治[3] ([1]福岡県工技セ、[2]SG ラボラトリー、[3]久留米高専)
○Shiro OKUMURA[1], Hideki KATAYAMA[1], Satoko YAMASHITA[1], Mami NAKAYAMA[2], Kanji TOMIOKA[3] ([1]Fukuoka ITC, [2]SG Laboratory, [3]Kurume NCT)

【目的】

飲料工場や半導体工場では、ペットボトルや IC チップの洗浄に過酸化水素が使われている。排水中の過酸化水素は活性炭や還元剤により処理されてきたが、近年カタラーゼによる分解が環境負荷の低い処理法としてシェアを伸ばしている。この分解処理は発熱反応であることから、処理中の温度上昇によりカタラーゼが失活して処理が不十分になるケースがあり、これを改善するために耐熱性の高いカタラーゼが必要とされている。一方、高温環境に生息する微生物は耐熱性の酵素を有していると推察され、目的に叶う耐熱性カタラーゼを産生する微生物も存在する可能性があるが、一般に特殊環境で生育する多種多様な微生物を分離、培養することは困難である。そこで、耐熱性カタラーゼ遺伝子を取得することを目的として、高温環境の土壌からメタゲノムライブラリーを構築し、リアルタイム PCR によるカタラーゼ遺伝子の探索を試みた。

【方法および結果】

塚原地獄（大分県)、雲仙地獄（長崎県)、栗野岳地獄（鹿児島県）において 49℃～90℃の環境にある土砂を採取し、市販のゲノム抽出キットもしくは Zhou らの方法[1)] によりこれらのサンプル中のメタゲノムを抽出した。次に、得られたメタゲノムを制限酵素により適切な長さに切断したのち、pSTV28 ベクター（タカラバイオ）に導入してメタゲノムライブラリーを構築した。ライブラリーの約 1,500 のクローンについて M13 プライマーで PCR を行い、増幅物を電気泳動して挿入 DNA 断片の有無およびその鎖長を確認した。カタラーゼ遺伝子のスクリーニングは前記 PCR 産物を希釈したものをテンプレートとし、カタラーゼの保存領域から設計した縮重プライマーを用いたリアルタイム PCR により行った。スクリーニングのポジティブコントロールとして、SG ラボラトリー保有のカタラーゼ産生菌株[2)] のカタラーゼ遺伝子を pSTV28 ベクターに導入し、これをテンプレートとし M13 プライマーを使用して得られた PCR 産物を用いた。このスクリーニングにより約 1,100 のクローンから 41 個のポジティブクローンが得られ、これらについて DNA シークエンスによる解析を行った。

1） Zhou J. et al., DNA recovery from soils of diverse composition. Appl. Environ. Microbiol., 62, 316-22 (1996).
2) Nakayama M. et al., High catalase production by *Rhizobium radiobactor* Strain 2-1. J. Biosci. Bioeng., 106, 554-8 (2008).

metagenome, catalase, hot spring

発表責任者：奥村史朗（sokumura@fitc.pref.fukuoka.jp）

講演番号：4C20a10
講演日時：3 月 20 日 11:45～ C 校舎 20 会場

# 洗濯環境および衣類に付着するバクテリア叢の解析

# Analysis of bacterial flora attached on laundry fabrics and in washing machineries.

○松村 吉信[1,2]、井上 貴晴[1]、佛淵 健士[1]、冨岡 敏一[1]、脇田 克也[3] ([1]関西大化学生命工、[2]関西大 ORDIST、[3]パナソニック・アプライアンス社)
○ Yoshinobu Matsumura[1,2], Takaharu Inoue[1], Takeshi Hotokebucho[1], Toshikazu Tomioka[1], Katsuya Wakita[3] ([1]Kansai Univ. Dept. Life Science & Biotechnology, [2]Kansai Univ. ORDIST, [3]Panasonic Cor.)

【背景・目的】衣類やタオル（綿布）などを繰り返し洗濯すると汚れや匂いが残存し、不快臭や異臭が発生する場合が多く報告されるようになった。最近では室内での衣類乾燥の頻度も増え、乾燥過程における異臭発生も問題視されるようになった。このため、衣類や洗濯過程における微生物制御の必要性が求められ、衣類や洗濯機などの抗菌化、洗剤や柔軟剤などによる洗濯中に抗菌処理が施されるようになった。しかしながら、現状では効果的に異臭発生が抑制できていない。一方、これまでの複数の研究で異臭発生の原因特定が試みられてきたが、異臭発生が直接的または間接的に微生物に起因するものと結論づけられるものの、一部の研究を除いて、特定のバクテリアに起因するとは推察しにくい。そこで本研究では、異臭発生綿布を中心に付着微生物細胞数と付着バクテリア叢の解析を行い、異臭発生の原因を解明すると共に、洗濯衣類の異臭発生の軽減に向けたシステム開発の基礎的研究を行っている。
【方法・結果】異臭綿布には 3 家庭で使用していた 3 種類の綿布を通常の洗濯・乾燥後に使用した。綿布に付着した微生物細胞はストマッカー法で抽出、DNA 抽出は Metagenomic DNA isolation kit for water (EPICENTRE 社)を用いた。微生物細胞数はバクテリアカウンターを用いた明視野顕微鏡観察とコロニーカウント法で計測した。バクテリア増殖培地には TSB 培地（37℃培養)、真菌類増殖培地には PDA（25℃培養）を用いた。バクテリア叢解析は Illumina 社 Miseq を用いた 16S rRNA 遺伝子領域を指標にメタゲノム解析を行った。その結果、未使用綿布からは $2.0x10^2$ [cfu/g 綿布] 以下の微生物細胞しか観察されなかったが、洗濯後の異臭綿布からは $2.0x10^5$ [cfu/g 綿布]以上のバクテリア細胞および $1.0x10^4$ [cfu/g 綿布]以上の真菌類が確認され、異臭発生と微生物汚染との間に高い相関が得られた。一方、16S rRNA 遺伝子領域を指標としたメタゲノム解析結果から、異臭綿布に付着したバクテリア叢は比較的多様性が低く、Alphaproteobacteria と Gammaproteobacteria で約 60%以上を占めていたものの、特定のバクテリア種が観察されるものではなく、洗濯機ごとに優占種のバクテリアも異なっていた。この結果は異臭発生の原因が特定のバクテリアの増殖によるものではないと予想される。今後、使用していた洗濯機に付着しているバクテリア叢や使用水由来のバクテリア叢解析をとおして異臭綿布に付着していたバクテリアの由来を特定する予定である。

biofilm, malodor, laundry

講演番号：4C20a11
講演日時：3 月 20 日 12:00～ C 校舎 20 会場

*Ktedonobacteria* 綱に属する放線菌様細菌の分子遺伝学的手法の検討
Development of a genetic analysis tool in an actinomyces-like bacterium affiliating with the class *Ktedonobacteria*

○水野 勇[1]、矢部 修平[2]、兼崎 友[3]、佐々木 康幸[4]、横田 明[2]、上田 賢志[1]、高野 英晃[1]([1]日大生資科・生命セ、[2]東北大院・農、[3]東農大・ゲノム解析セ、[4]東農大・応生科・バイオ)
○Isamu MIZUNO[1], Syuhei YABE[2], Yu KANESAKI[3], Yasuyuki SASAKI[4], Akira YOKOTA[2], Kenji UEDA[1], Hideaki TAKANO[1] ([1]Nihon Univ., [2]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [3]Genome Research Center, Tokyo Univ. Agric., [4]Dept. Biosci., Tokyo Univ. Agric.)

［目的］クロロフレクサス門に属する真正細菌であるクテドノバクテリア綱は、2 目 3 科 3 属 6 種で構成される。その特徴は、一つの細胞から出芽によって複数形成される胞子が、その発芽の後に *Streptomyces* 属放線菌に類似した生活環を辿って増殖することである。クテドノバクテリア綱の代表株である *Thermosporothrix hazakensis* SK20-1 は、部分的なゲノム情報の中にも、放線菌に匹敵する数の二次代謝産物合成遺伝子群が存在することが判明している。放線菌は抗生物質など様々な生理活性物質の単離源として利用されてきたが、昨今では新規物質が見いだされる頻度が顕著に低下している。そこで本研究では、新たな資源として期待される分類群に属する *T. hazakensis* のゲノムを完全に解読するとともに、その遺伝子操作法の確立を目的とした検証を進めた。
［結果・考察］１分子ゲノムシーケンサーPacBio RS II によるゲノム配列の再解析を行った結果、*T. hazakensis* のゲノムは約 7 Mbp、コンティングが 3 本までに繋がった。ギャップ領域探索を試みたが、ゲノム完全解読には至らなかった。このゲノム解析から、*T. hazakensis* の二次代謝産物生合成遺伝子クラスターが 21 個存在することが予想された。それらの発現時期を調べるためにセミ定量 RT-PCR による転写解析を行った結果、21 個のクラスターのうち 17 個が転写されていた。また、いくつかの遺伝子についてはその時期特異的な発現が観察された。

溶原性ファージは、宿主染色体への挿入能を有することから、細菌の染色体組み込み型ベクターに利用されている。そこで、*T. hazakensis* およびその類縁菌（合計 17 株）を対象に溶原性ファージの探索を試みた。ファージの誘発はマイトマイシン C（MMC）処理によって行った。MMC 処理した本菌の培養上清を濃縮し透過型電子顕微鏡で観察したところ、類縁菌 16 種中 7 種にファージ粒子の存在が認められた。粒子の形態から、それらはいずれも *Siphoviridae* に分類されると予想された。ファージが観察された株の一つである *Thermosporothrix* sp. MYC 株の全ゲノム解析を行ったところ、23.7 kbp から成るプロファージと予想される領域を見出すことに成功した。ここで見出されたプロファージ領域の末端には部位特異的組み換え部位である *att* サイトと考えられる配列が存在し、その一方の近傍にはインテグラーゼをコードする遺伝子が存在していた。また、MMC 処理した培養上清から調製したファージ画分を鋳型にした PCR を行ったところ、上記のプロファージ領域内に存在する遺伝子が検出された。このことから、上述の領域はプロファージをコードしており、MMC によってファージの誘発がおこると考えられた。現在、本ファージを活用したベクターの構築を行っている。

*Ktedonobacteria*, *Thermosporothrix hazakensis* , transformation

講演番号：4C23a01
講演日時：3 月 20 日 09:20～ C 校舎 23 会場

# C14 fatty acid production by the oomycete *Plectospira myriandra*

○Brian Mo, Akinori Ando, Hirotaka Asai, Jun Ogawa (Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

Long-chain fatty acids (LCFAs) are molecules containing over twelve carbon atoms, and are found in edible fats such as olive, coconut and fish oils. Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs) in particular are metabolically, energetically and structurally important biochemical compounds. Other than functioning as energy storage materials and structural components of the lipid membrane, LCPUFAs are important precursors of signalling molecules, mediators of inflammatory disorders, and are essential to prenatal brain growth and visual development.

Previously, we have reported biological production of LCPUFAs such as arachidonic acid (AA, 20:4n-6), eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) by screening for microorganisms accumulating beneficial LCFAs. One of the strains producing EPA, an oomycete *Plectospira myriandra* NBRC 32548, showed unique characteristics of C14 fatty acid accumulation at significantly high levels.

In this study, we investigated C14 fatty acid production by this strain. The strain was incubated in GY medium containing 2% glucose as C source and 1% yeast extract as N source, then incubated at 28$^{o}$C with 90 rpm shaking for ten days. After esterification, the resulting fatty acid methyl esters (FAMEs) were purified by high-performance liquid chromatography (HPLC). Fractionated FAMEs with more than 95% purity were then analyzed by H-NMR spectroscopy. These fatty acids were identified to be tetradecanoic acid (myristic acid, C14:0) and *cis*-5-tetradecenoic acid (physeteric acid, C14:1n-9), which took up 13% and 31% of the total fatty acid composition.

Long-chain fatty acids, Polyunsaturated fatty acids, *Plectospira myriandra*

発表責任者：Jun Ogawa（ogawa@kais.kyoto-u.ac.jp）

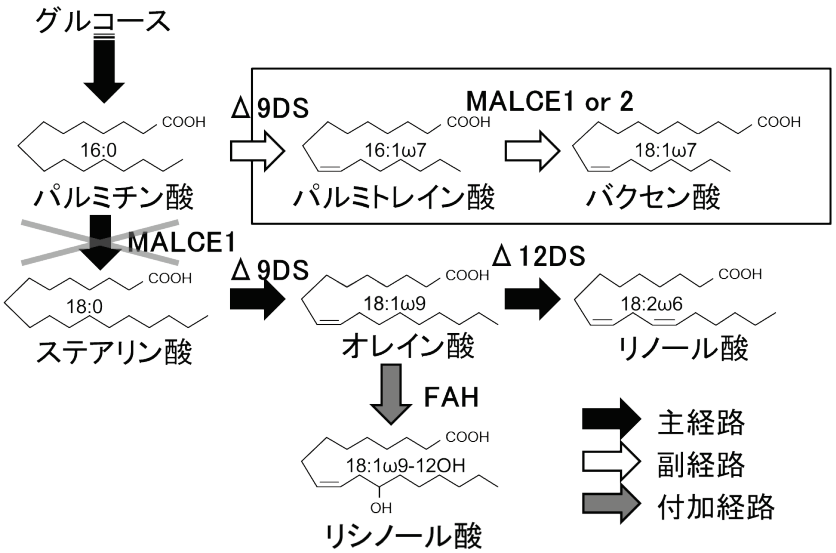
講演番号：4C23a02
講演日時：3 月 20 日 09:35～ C 校舎 23 会場

油糧糸状菌 *Mortierella alpina* から誘導したリシノール酸生産性変異株について
Characterization of ricinoleic acid-producing mutants derived from oleaginous fungus *Mortierella alpina*

○井出 紗奈江[1]、阪本 鷹行[1]、安藤 晃規[2]、岸野 重信[2]、和泉 自泰[3]、馬場 健史[3]、島 純[4]、小川 順[2]、櫻谷 英治[1]（[1]徳島大・生物資源、[2]京大院農・応用生命、[3]九大・生体防御、[4]龍谷大・農）
○Sanae IDE[1], Takaiku SAKAMOTO[1], Akinori ANDO[2], Shigenobu KISHINO[2], Yoshihiro IZUMI[3], Takeshi BAMBA[3], Jun SHIMA[4], Jun OGAWA[2], Eiji SAKURADANI[1] ([1]Fac. Biosci. Bioindus., Tokushima Univ., [2]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [3]Medical Institute Bioregulation, Kyushu Univ., [4]Fac. Agric., Ryukoku Univ.)

【目的】我々はこれまでに、油糧糸状菌 *Mortierella alpina* におけるアラキドン酸（20:4ω6）などの高度不飽和脂肪酸生合成経路を明らかにした。また、遺伝子突然変異誘発剤である *N*-メチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン（MNNG）を用いた変異導入によって、脂肪酸組成が改変された多様な変異株を誘導した。さらに最近では、本菌株の遺伝子組換え系を利用して、*M. alpina* の変異株に脂肪酸水酸化酵素遺伝子を導入することで、ポリマー原料として注目されるリシノール酸（18:1ω9-OH）の生産に取り組んでいる。本研究では、リシノール酸生産性分子育種株を MNNG 処理することで、脂肪酸生産性の改善を試みた。

【方法・結果】リシノール酸生産株の胞子を終濃度 0.1～0.2 mg/ml の MNNG に 15～20 分間暴露した後、GY 寒天培地（グルコース 2%，酵母エキス 1%，寒天 2%）上で培養し、生育したコロニーを単離した。本変異処理によって菌体外に脂質を漏出する変化株が複数得られた。これらの漏出変異株は、親株としたリシノール酸生産株と同様の脂肪酸組成を示した。約 400 株の脂肪酸組成分析の結果、変異株 CN1#22 において総脂肪酸当たり約 16%のバクセン酸（18:1ω7）が検出され、さらにバクセン酸由来と思われる 18:2 脂肪酸も検出された。これまでに取得した変異株 M1 においてはパルミチン酸（16:0）をステアリン酸（18:0）へと変換する鎖長延長酵素（MALCE1）遺伝子の変異によりパルミチン酸が蓄積し、バクセン酸も約 8%蓄積することが明らかになっている(右図参照)。そこで現在、CN1#22 株の *malce1* 遺伝子について変異の有無を調べている。




*M. alpina*の脂肪酸生合成経路
DS; 不飽和化酵素，MALCE; 鎖長延長酵素，FAH; 水酸化酵素

*Mortierella alpina*, Vaccenic acid, MALCE1

発表責任者：櫻谷英治（sakuradani.eiji@tokushima-u.ac.jp）

講演番号：4C23a03
講演日時：3 月 20 日 09:50～ C 校舎 23 会場

組換え大腸菌によるグルコースを原料とする 4-アミノ桂皮酸の直接発酵生産
Single-step production of 4-aminocinnnamic acid from glucose by recombinant *Escherichia coli*
○川口 秀夫[1]、若井 桂子[1]、桝尾 俊介[3]、高谷 直樹[3]、荻野 千秋[2]、近藤 昭彦[1,2] ([1]神戸大院イノベ、[2]神戸大院工、[3]筑波大生命環境)
○Hideo KAWAGUCHI[1], Keiko WAKAI[1], Shunsuke MASUO[3], Naoki TAKAYA[3], Chiaki OGINO[2], Akihiko KONDO[1,2] ([1]Kobe Univ. Innov., [2]Kobe Univ. Eng., [3]Univ. Tsukuba)

【背景と目的】ポリ乳酸など従来の脂肪族バイオポリマーは、耐熱性と機械的強度が低いため、用途が限定される。一方、芳香族ポリマーであるポリベンゾイミダゾール（PBI）は、プラスチックの中で、最も高い耐熱性と機械的強度を示す高性能なスーパーエンジニアリングプラスチックの代表であり、ガラス代替素材など多様な用途展開が期待されている。4-アミノ桂皮酸は（4ACA）を原料とする PBI は、ポリカーボネートの 6 倍に相当する高い力学強度（>400 MPa）と高い透明度を示し、石油代替となるバイオエンプラとして注目されている。しかし、従来のバイオ生産方式は、組換え微生物による糖類の発酵とバイオコンバージョンを組み合わせた２段階プロセスで構成されていた。そこで本研究では、このバイオ PBI 原料の生産プロセスを効率化することを目的に、組換え大腸菌を用いた 4-アミノ桂皮酸（4ACA）の一段階発酵生産を検討した。

【結果と考察】フェニルアラニン高生産大腸菌 NST37 に、微生物由来の *papABC* を導入した 4-アミノフェニルアラニン（4APhe）生産株を宿主に、酵母由来の phenylalanine ammonia-lyase (RgPAL)を共発現させた組換え大腸菌を作製した。作成した 4ACA 生産株は、グルコースを単一炭素源とする最少培地で、4ACA を一段階で発酵生産することができた。培養温度、通気条件、IPTG 添加濃度の最適化を行った結果、グルコース（10 g/L)から 18 mg/L の生産性で 4ACA を得た。4ACA の生産量は初期グルコース濃度の影響を強く受けており、最適条件であるグルコース（60 g/L)の条件では、約 380 時間の培養で 280 mg/L の 4ACA を生産することができた。しかし、培養期間が長いこと、発酵中に 4ACA の前駆体である 4APhe が著量に蓄積することから、4APhe から 4ACA への最終変換反応が、グルコースからの発酵生産における律速段階であることが明らかとなった。この最終変換反応を効率化するために、培養期間中期に RgPAL のみを高発現させた組換え大腸菌を追添加した培養を検討したので、この結果等についても、あわせて報告する。

【謝辞】本研究は科学技術振興機構(JST)による先端的低炭素化技術開発(ALCA)の助成を受けて実施した

*Escherichia coli*, 4-aminocinnnamic acid, metabolic engineering

講演番号：4C23a04
講演日時：3 月 20 日 10:05～ C 校舎 23 会場

# 組み換え乳酸菌を用いたデンプンからの D-乳酸の直接発酵生産

# Direct production of D-lactic acid from starch of an engineered lactic acid bacterium

○椿 幹和、小原 仁実、麻生 祐司（京都工繊大院）
○Mikikazu TSUBAKI, Hitomi OHARA, Yuji ASO (Kyoto Institute of Technology)

【目的】ステレオコンプレックス型ポリ乳酸 sc-PLA は生分解性と耐熱性に優れる。しかし、原料となる D-乳酸の工業生産量は L-乳酸に比べて少なく、sc-PLA の利用は限られている。よって、デンプンから光学純度の高い D-乳酸を高生産する乳酸菌を開発できれば、アップストリームプロセスの簡略化と D-乳酸の大量供給が実現できる。そこで、本研究では L-乳酸を生産する乳酸菌 *Lactococcus lactis* NZ9000 の L-乳酸脱水素酵素遺伝子 *L-ldh* を *D-ldh* に置換するとともに α-アミラーゼ遺伝子 *amyA* を発現させることで、デンプンから D-乳酸を直接発酵生産する乳酸菌の開発を試みた。
【方法】相同組み換えにより NZ9000 株の *L-ldh* を *Lactobacillus delbrueckii* JCM1107 由来 *D-ldh* に置換し AH1 株を得た。NZ9000 株と本株を GM17 培地(0.5%グルコース含む)にて 24 h 培養後、乳酸濃度と光学純度、菌体量 $OD_{600}$、比増殖速度 μ、L-, D-Ldh 活性を比較した。L-, D-Ldh 活性は各株粗酵素液に L-, D-乳酸と $NAD^+$を添加した後 NADH 生成速度から求めた。D-乳酸光学純度は各株休止菌体を 1%グルコース含有リン酸緩衝液に添加後、上清をキラルクロマトグラフィーに供し求めた。*Streptococcus bovis* 148 由来 *amyA* を発現ベクターpNZ8048 にクローニング後、AH1 株に導入し AH2 株を得た。本株の培養液に nisin A を添加し *amyA* を発現後、上清中の α-アミラーゼ活性を比色法により測定した。AH1 株と AH2 株を 2%デンプン／グルコースを炭素源とし 24 h 培養後、乳酸濃度と $OD_{600}$ を比較した。
【結果と考察】NZ9000 株と AH1 株を培養後、各パラメータを測定した。その結果、両株はそれぞれ乳酸濃度：7.28, 7.03 g/L、D-乳酸光学純度：0.0, 84.5%、$OD_{600}$：2.6, 2.5、μ：0.59, 0.56 $h^{-1}$、L-Ldh 活性：0.20, 0.06 U/mg、D-Ldh 活性：0.00, 0.19 U/mg を示した。よって、NZ9000 株にて *ldh* を置換することで、菌体増殖性に影響を及ぼさずに D-乳酸を生産する乳酸菌を作製できることが示された。次に、AH2 株の培養液上清中の α-アミラーゼ活性を調べたところ、0.27 U/mL であった。よって、nisin A の添加により AH2 株は α-アミラーゼを分泌生産することが示された。さらに、2%グルコースを炭素源として AH1 株と AH2 株を培養した結果、両株はそれぞれ乳酸濃度：23.5, 24.8 g/L、$OD_{600}$：5.1, 6.9 を示した。一方、2%デンプンを炭素源として AH2 株を培養した結果、本株は乳酸濃度：15.9 g/L、$OD_{600}$：2.8 を示した。よって、グルコースと比べてデンプンを炭素源とした場合、デンプンの資化速度が遅く AH2 株の菌体増殖性と乳酸生産性が低下することがわかった。以上の結果より、AH2 株において D-Ldh 活性と α-アミラーゼ活性を向上させつつ L-Ldh 活性を抑制することで、D-乳酸の生産性と光学純度をさらに改善できると考えられた。

D-lactic acid, *Lactococcus lactis*, fermentation

講演番号：4C23a05
講演日時：3 月 20 日 10:20～ C 校舎 23 会場

吟醸用群馬 KAZE 酵母のイオンビーム照射による尿素非生産化の検討
Breeding of non-urea producing mutants from Gunma Ginjyo-sake yeast *Saccharomyces cerevisiae* KAZE2 by ion-beam induced mutagenesis
○渡部 貴志[1]、佐藤 勝也[2]、林 秀謙[3]、高橋 仁恵[1]、増渕 隆[1] ([1]群技セ、[2]量研機構、[3]前橋工大)
○Takashi WATANABE[1], Katsuya SATOH[2], Hidenori HAYASHI[3], Hitoe TAKAHASHI[1], Takashi MASUBUCHI[1] ([1]GITC, [2]QST, [3]Maebashi Inst. Technol.)

【背景・目的】政府の「クールジャパンの輸出戦略」に則り、清酒の海外輸出量が順調に伸びており、酒蔵にとって大きなビジネスチャンスとなっている。また、輸出先のターゲットである欧米諸国では、清酒をライスワインとして認知・高評価しているが、地方ワインをテロワールとして好む傾向があり、清酒も地酒が好まれている。群馬県が独自に開発した群馬 KAZE 酵母は、香気成分のカプロン酸エチルを高生産するため吟醸用に適しており、群馬県内の海外輸出量も 3 年間で 1.7 倍に増加している。しかしながら、今後の清酒の海外輸出量拡大を目指すに当たり、特に発がんリスクが懸念されているカルバミン酸エチルの生成をなくすことが課題である。カルバミン酸エチルは、清酒酵母が副産物として生産する尿素が、清酒中のエタノールと非生化学的に生じる物質であり、熟成を経た古酒に多く含まれる。一方、群馬 KAZE 酵母は薬剤変異処理を経て得られた株であり、既に報告のある自然変異の方法では、尿素非生産化株を得られなかった。そこで本研究では、変異誘発率が高く、変異スペクトルが広いイオンビーム照射によって、群馬 KAZE 酵母の尿素非生産化変異株の取得を試みた。
【方法・結果】清酒酵母はアルギナーゼを生産し、アルギニンをオルニチンと尿素に分解することから、尿素を生産しない酵母を得るためには、アルギナーゼを生産しない酵母を取得すればよい。その選抜には、アルギニンのアナログであるカナバニン耐性となった株を選抜するという方法が用いられている。しかしながら、従来の方法では、群馬 KAZE 酵母は、硫黄成分を菌体に蓄積することでカナバニンを無毒化し、選択培地に偽陽性株が生えてきてしまうような傾向が見られた。そこで、安価なカナバニン硫酸塩を用いることを止め、前培養菌体を硫安とアミノ酸を除いた最少培地で窒素飢餓処理をした後、アルギニンとオルニチンの添加量を半量にした選択培地に塗布することによって、偽陽性株が生えなくなることを確認した。なお、上記の選択培地を 3 週間培養した結果、自然変異によるカナバニン耐性株が 4 株得られたが、既存の報告の発生率と比較して 10 分の 1 以下と低頻度であった。次に、量研機構高崎量子応用研究所 TIARA にて、炭素イオンビーム（$^{12}C^{5+}$、220MeV）を照射（75～200Gy）し、カナバニン耐性株の出現頻度を調べた。その結果、100Gy 照射の際に最も効率的にカナバニン耐性株を得ることが出来た。自然変異株も含め、これまでに得られたカナバニン耐性となった 50 株を用い、液体培地で発酵試験を行った結果、全ての株が尿素非生産性であることを確認した。現在は、これらの変異株のうち、発酵経過が良く、香気成分の生産能が高い 8 株を選抜し、醸造工程を模した小仕込み試験での発酵経過を調べている。

ion-beam induced mutagenesis, non-urea producing mutants, Gunma Ginjyo-sake yeast

発表責任者：渡部貴志（watanabe-t@pref.gunma.lg.jp）

講演番号：4C23a06
講演日時：3 月 20 日 10:35～ C 校舎 23 会場

生酛乳酸菌の共存が誘導する清酒酵母の炭素代謝改変及び清酒醸造への効果
Carbon metabolism modification of sake yeast by coexistence with kimoto lactic bacteria and its influence on sake making

○伊藤 稔[1]、渡辺 大輔[1]、杉本 幸子[1]、大橋 正孝[2]、山田 翼[3]、高橋 俊成[3]、高木 博史[1]([1]奈良先端大バイオ、[2]奈良産総セ、[3]菊正宗酒造(株))
○Minoru ITO[1], Daisuke Wtanabe[1], Yukiko Sugimoto[1], Masataka Ohashi[2], Tsubasa Yamada[3], Toshinari Takahashi[3], Hiroshi Takagi[1] ([1]Nara Inst. Sci and Tec., [2]Nara Pref. Inst. Ind. Dev., [3]Kiku-Masamune Sake Brewing Co., Ltd)

プリオンとはタンパク質性の遺伝因子であり、酵母においても近年、代謝や環境の変動に応答し、表現型を変化させるプリオンの存在が知られている。その中で、[*GAR*$^+$]（glucose-associated repression の略）と呼ばれるプリオンは、グルコースと他の炭素源が混在する環境下においてもグルコース抑制を解除し、炭素代謝を変化させることが報告された（Jarosz *et al*., *Cell*, 2014）。興味深いことに、[*GAR*$^+$]は一部の細菌との共存によって誘導頻度が向上することから、酵母と細菌の共存環境下において、酵母の炭素代謝調節に[*GAR*$^+$]が関与している可能性が考えられる。我々は、伝統的な清酒醸造の手法である「生酛造り」における酵母と乳酸菌の共存に着目した。生酛乳酸菌由来の代謝産物が生酛造りに特有の風味を生成することは知られているが、乳酸菌との相互作用が清酒酵母の炭素代謝に及ぼすのか影響については不明である。そこで本研究では、清酒酵母における[*GAR*$^+$]誘導と生酛乳酸菌との共存による効果について調べるとともに、[*GAR*$^+$]誘導が清酒醸造に及ぼす影響についても解析を行った。

本研究において、[*GAR*$^+$]誘導株はグルコース存在下でもグルコース以外の炭素源（グリセロールや有機酸など）を資化できるという表現型に着目した。ただし、グルコースが代謝されて枯渇すると、[*GAR*$^+$]誘導の有無に関わらずグルコース抑制が解除されてしまうため、酵母の細胞内で代謝されないグルコースアナログであるグルコサミンを用いることとした。その結果、清酒酵母の中で一般的な K701 株および生酛造りに用いられる Km67 株のいずれも、グリセロール-グルコサミン含有培地において低頻度でコロニーを形成したことから、清酒酵母も[*GAR*$^+$]を自発的に誘導できることを初めて見出し、その頻度は実験室株よりも高いことを明らかにした。また、同様の環境において、酵母を２種類の生酛乳酸菌（*Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus sakei*）と共存させることで[*GAR*$^+$]の誘導が促進されることも判明し、生酛乳酸菌には[*GAR*$^+$]の誘導を促進する働きがあることを見出した。乳酸の生成への寄与が小さい *L. mesenteroides* の方が強い誘導能を示し、生酛造りでの新たな役割が示唆された。さらに、生酛乳酸菌による[*GAR*$^+$]の誘導については、K701 株より Km67 株において顕著な効果を示した。以上の結果から、生酛造りにおいて乳酸菌が酵母の[*GAR*$^+$]の誘導を促進しており、酵母自身も[*GAR*$^+$]の誘導を受けやすくなるように適応した可能性が考えられる。最後に、[*GAR*$^+$]誘導株を用いた清酒小仕込試験を行った。その結果、アルコール発酵速度の低下と清酒中の酢酸量の減少が認められ、グルコース抑制の解除という表現型と合致するデータが得られた。このことから、生酛造りにおける[*GAR*$^+$]の誘導には、オフフレーバー（酸臭）を減少させるメリットがある可能性も示された。

[*GAR*$^+$], Kimoto, Sake making

発表責任者：高木博史（hiro@bs.naist.jp）

講演番号：4C23a07
講演日時：3 月 20 日 11:00～ C 校舎 23 会場

# アルコール発酵制御に関わる新規遺伝子の探索から明らかになった酵母 VTC 複合体の役割

# Role of *Saccharomyces cerevisiae* VTC complex revealed by exploration of novel regulatory genes for alcoholic fermentation

○吉岡 直哉、渡辺 大輔、高木 健一、杉本 幸子、高木 博史（奈良先端大バイオ）
○NAOYA YOSHIOKA, DAISUKE WATANABE, KENICHI TAKAGI, YUKIKO SUGIMOTO, HIROSHI TAKAGI (Nara Inst. Sci. and Tech.)

出芽酵母 *Sacccharomycyces cerevisiae* は、様々な発酵産業に広く用いられているが、複雑かつ厳密に調節されているアルコール発酵能を人為的に改変することは容易ではない。我々は現在までに、分類学上 *S. cerevisiae* に属し、優れたアルコール発酵能を示す清酒酵母の研究を通して、Greatwall ファミリープロテインキナーゼをコードする *RIM15* 遺伝子の機能欠損がアルコール発酵能の上昇に繋がることを見出している。*RIM15* 産物（Rim15p）は、グルコースからの UDP-グルコース合成を介した糖質同化経路を促進することで、解糖およびアルコール発酵を負に制御している。しかしながら、このメカニズムが *S. cerevisiae* におけるアルコール発酵調節を担う唯一のものかどうかについては十分に理解されていない。そこで、本研究では、*S. cerevisiae* におけるアルコール発酵調節メカニズムの全体像を明らかとするために、アルコール発酵能に影響を及ぼす遺伝子を網羅的に探索し、解析した。

Euroscarf から頒布されている *S. cerevisiae* の遺伝子ノックアウト株コレクション（4,949 株）を用いて 20%グルコースを含む YPD 培地で 3 日間培養し、二酸化炭素の発生量を測定することで発酵速度の解析を行った。その結果、遺伝子破壊によってアルコール発酵速度が 85%以下に低下した 220 遺伝子（発酵促進遺伝子）および、アルコール発酵速度が野生型株と比較して 115%以上に上昇した 286 遺伝子（発酵抑制遺伝子）を同定した。前者には、V-ATP アーゼサブユニット、RNA ポリメラーゼサブユニットをコードする遺伝子（*VMA*, *RPB*）などが、後者には、既知の *RIM15* 遺伝子に加え、ユビキチン特異的プロテアーゼ、減数分裂関連タンパク質をコードする遺伝子（*UBP*, *SPO*）などがそれぞれ含まれており、アルコール発酵調節メカニズムが様々な生命現象と関連している全体像が明らかになった。さらに我々は、アルコール発酵との関連が未知であった液胞トランスポーターシャペロン（VTC）複合体の機能欠損がアルコール発酵速度を顕著に上昇させる点に着目した。VTC 複合体とは、膜輸送、ポリリン酸合成・蓄積、ミクロオートファジーなどに関与する液胞局在型の膜タンパク質で、Vtc1p, Vtc3p, Vtc4p の 3 つのサブユニットから構成されており、いずれかの機能欠損により複合体全体の機能が失われることが知られている。実際に、各単独破壊株において、アルコール発酵速度の上昇（*Δvtc1*:170.8%, *Δvtc3*:134.2%, *Δvtc4*:149.2%）が共通して示された。さらに、実験室酵母だけではなく、パン酵母およびバイオエタノール酵母のような産業酵母においても、*VTC1* 遺伝子の破壊がパン生地発酵速度および糖蜜発酵速度をそれぞれ上昇させることを見出した（渡辺ら、特願 2016-025324）。以上の結果から、VTC 複合体がアルコール発酵を負に制御する新規因子として同定された。

alcoholic fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*, VTC complex

発表責任者：高木博史（hiro@bs.naist.jp）

講演番号：4C23a08
講演日時：3 月 20 日 11:15～ C 校舎 23 会場

ビール醸造におけるアルコール発酵と *S*-アデノシルメチオニンの関連について
Association between alcoholic fermentation and *S*-adenosylmethionine in beer brewing

○渡辺 大輔[1]、大室 繭[2]、杉本 幸子[1]、梶原 拓真[1]、加藤 拓[2]、本山 靖朗[2]、渡邊 哲也[2]、高木 博史[1] ([1]奈良先端大、[2]アサヒビール(株))
○Daisuke WATANABE[1], Mayu OOMURO[2], Yukiko SUGIMOTO[1], Takuma KAJIHARA[1], Taku KATO[2], Yasuo MOTOYAMA[2], Tetsuya WATANABE[2], Hiroshi TAKAGI[1] ([1]NAIST, [2]ASAHI BREWERIES, LTD.)

ビール醸造に欠かすことのできないアルコール発酵は、人類にとって最も身近な微生物機能の一つであるが、酵母細胞内における調節メカニズムについては多くの謎が残されている。我々は以前に、*Saccharomyces cerevisiae* に属する清酒酵母の高発酵メカニズムの一端を解明し（Watanabe *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.* 2011; Watanabe *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* 2012; Watanabe *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* 2016)、その知見を応用して下面発酵酵母 *S. pastorianus* の発酵速度を改変することに成功している（Oomuro *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.* 2016)。本研究では、高発酵力を付与した *S. pastorianus* が発酵過程において *S*-アデノシルメチオニン（SAM）を高含有するという新たな発見に基づき、ビール醸造における SAM とアルコール発酵の関係に関する解析を実施した。

まず、SAM が発酵調節に関与する可能性を探るために、培地（合成培地または麦汁）への添加が、*S. pastorianus* Weihenstephan 34/70 株を用いたアルコール発酵に及ぼす影響を調べた。その結果、終濃度 0.1 mM 以上となるように SAM を培地中に添加することにより発酵速度の有意な上昇が認められた。一方、SAM 生合成の基質であるメチオニンの添加は同等の効果を示さなかったことから、SAM 合成が発酵調節に関わるというよりもむしろ、SAM 自身が未知のメカニズムによりアルコール発酵を正に制御しているのではないかと推測された。次に、*S. cerevisiae* を用いて、SAM 合成・代謝関連遺伝子の改変がアルコール発酵に及ぼす影響を調べた。その結果、SAM 合成酵素をコードする *SAM1* および *SAM2* 遺伝子の二重破壊による効果は小さかったのに対し、SAM の代謝により生じるアデノシンを AMP に変換するアデノシンキナーゼをコードする *ADO1* 遺伝子の破壊により発酵速度が顕著に上昇することを明らかにした。Ado1p の機能欠損は SAM の代謝を妨げることで高蓄積につながることが報告されており、この結果からも SAM 合成促進ではなく SAM 高含有が高発酵力をもたらす一因であることが示唆された。さらに興味深いことに、*ADO1* 遺伝子破壊による発酵速度の上昇は、ビール醸造で用いられる低温条件において特異的に見られる現象であることも見出された。ただし、Weihenstephan 34/70 株を用いた場合、*S. cerevisiae* 型 *ADO1* 遺伝子（*SC-ADO1*）の破壊による SAM 含有量およびアルコール発酵への影響は認められなかった。*S. pastorianus* は *S. cerevisiae* および *S. eubayanus* の交雑により生じた高次倍数体であるため、*S. eubayanus* 型 *ADO1* 遺伝子（*SE-ADO1*）の破壊による影響についても併せて解析を行う必要がある。以上のデータを端緒として、今後、SAM による発酵調節のための標的因子を同定することで、ビール醸造における新規発酵調節メカニズムの解明を目指したい。

alcoholic fermentation, *S*-adenosylmethionine, *Saccharomyces pastorianus*

発表責任者：高木博史（hiro@bs.naist.jp）

講演番号：4C23a09
講演日時：3 月 20 日 11:30～ C 校舎 23 会場

# 高濃度エタノールによる翻訳抑制下で優先的に翻訳される *BTN2* mRNA のワイン酵母での解析
# Preferential expression of *BTN2* in wine yeast under pronounced translation repression caused by severe ethanol stress

加藤 沙枝、山内 雪菜、○井澤 真吾（京工繊大応生）
Sae KATO, Yukina YAMAUCHI, ○Shingo IZAWA (Kyoto Inst. Technol.)

【目的】翻訳抑制ストレス下では、多くの遺伝子は転写が活性化されても翻訳産物の新規合成が行われず、その発現はブロックされてしまう。これらの翻訳抑制を引き起こすストレス下では、不要不急の mRNA が細胞質中の P-body や stress granule に隔離される一方で、ストレスへの対処に必要とされるごく一部の mRNA は優先的・選択的にリボソームで翻訳されることが知られている(Zid and O'Shea, 2014)。高濃度エタノールは酵母の翻訳活性を強く抑制するが、*BTN2* mRNA は優先的に翻訳されることを我々は明らかにしている(Yamauchi and Izawa, 2016)。さらに、*BTN2* プロモーター($BTN2_{Pro}$)を用いることで、他の遺伝子も高濃度エタノール存在下で優先的に発現させることが可能であった。今回、急激なエタノール濃度の上昇だけでなく、醸造過程のように徐々にエタノール濃度が上昇した際にも翻訳が抑制され、*BTN2* の優先的な発現が誘導されるのか検討を行った。
【結果と考察】醸造過程を模した発酵試験を実施するために、$BTN2_{Pro}$-*BTN2-FLAG*-$BTN2_{Ter}$ をゲノムに組み込んだワイン酵母などの実用酵母株を構築した。実験室酵母同様にワイン酵母でも 10% エタノールストレスによる翻訳抑制下で *BTN2* の発現が誘導されることが確認された。次に、22%のグルコースを含む栄養培地(YPHD 培地)を用いて発酵試験を行ったところ、エタノール濃度の上昇に伴って翻訳活性が抑制されることがポリソーム解析で明らかとなった。また、*BTN2* の発現を検討したところ、*BTN2* の転写活性化と Btn2 タンパク質の合成がエタノール濃度の上昇によって誘導された。さらに、$BTN2_{Pro}$ を用いた他の遺伝子の発現も、エタノール濃度の上昇に伴って誘導された。これらの結果から、徐々にエタノール濃度が上昇する醸造過程でも酵母の翻訳活性は抑制され、*BTN2* mRNA は優先的に翻訳されることが強く示唆された。
【参考文献】: Zid and O'Shea (2014) *Nature*, **514**, 117-121 ; Yamauchi and Izawa (2016) *Front. Microbiol.*, **7**, 1319.

ethanol stress, translation repression, wine yeast

発表責任者：井澤真吾（thioredoxin@kit.ac.jp）

講演番号：4C23a10
講演日時：3 月 20 日 11:45～ C 校舎 23 会場

清酒醪で優先的に発現する酵母遺伝子の探索
Screening of yeast genes preferentially expressed during sake brewing
○濱砂 孝文[1]、佐田 尚隆[1]、徳井 美里[1]、山内 隆寛[1]、山下 伸雄[1]、明石 貴裕[1]、井澤 真吾[2]([1]白鶴酒造・研究、[2]京工繊大・応生)
○Takafumi HAMASUNA[1], Naotaka SADA[1], Misato TOKUI[1], Takahiro YAMAUCHI[1], Nobuo YAMASHITA[1], Takahiro AKASHI[1], SHINGO IZAWA[2] ([1]HAKUTSURU Sake Brewing CO.,LTD., [2]Kyoto Inst. Tech)

【目的】
高濃度エタノール存在下では、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の mRNA の多くは翻訳活性が阻害され、一部の限られた遺伝子が優先的に翻訳されることでエタノールストレスに応答していることが報告されている。酵母にとって清酒醪は、アルコールストレスだけでなく、低温、低 pH、低酸素、高浸透圧など様々なストレスが複雑に絡み合う過酷な環境といえる。そのため、醪環境下においてもエタノールストレス応答と同様に、優先的に翻訳される遺伝子が清酒酵母の醪ストレス耐性に関わることが予想される。そこで我々は、清酒酵母の醪ストレス耐性機構を解明することを目標に、醪環境下において優先的に翻訳される遺伝子の同定を試みた。

【方法と結果】
清酒醪中における酵母の翻訳活性を確認するために、醪の各留後日数（留 4、8、12、18）の清酒酵母から RNA を抽出し、ポリソームの形成を解析した。その結果、留 4 ではポリソーム画分が確認され、活発な翻訳が行われていることが分かった。一方で、留 8 以降では明瞭なポリソーム画分が認められず、翻訳活性はほぼ失われていると考えられた。このことから、清酒醪の留 8 以降において清酒酵母は必要最小限の遺伝子のみを優先的に翻訳し、それらの遺伝子が醪ストレスに応答するために機能しているのではないかと考察した。そこで、留 8 で優先的に翻訳されている遺伝子を調べるために、留 4 と留 8 のポリソーム画分に含まれる mRNA に対してマイクロアレイ解析を行った。その結果、留 8 のポリソーム画分において、留 4 と比較して有意に多く存在する遺伝子をいくつか抽出することが出来た。以上、マイクロアレイ解析の結果から、醪中期以降、酵母はストレスが多い特殊な環境と連動して特定の遺伝子を選択的に翻訳していることが示唆された。
これらの遺伝子を破壊した実験室酵母株を用いて総米 100 g の小仕込み試験を実施している。

SAKE, polysome, gene expression

発表責任者：濱砂　孝文（takafumi-hamasuna@hakutsuru.co.jp）

講演番号：4C23a11
講演日時：3 月 20 日 12:00～ C 校舎 23 会場

# 変異チオール酸化酵素による酵母の酸化型グルタチオン生産

# Enzymatic improvement of mitochondrial thiol oxidase Erv1 for fermentative oxidized glutathione production in Saccharomyces cerevisiae

○小林 淳平[1]、佐々木 大介[1]、原 清敬[2]、蓮沼 誠久[1]、近藤 昭彦[1] ([1]神大院・イノベ、[2]静県大・食品栄養)
○Jyumpei KOBAYASHI[1], Daisuke SASAKI[1], Kiyotaka Y HARA[2], Tomohisa HASUNUMA[1], Akihiko KONDO[1] ([1]Kobe Univ., [2]Univ. Shizuoka)

【目的】我々は遺伝子工学的手法による、*Saccharomyces cerevisiae* のグルタチオン生産を研究している。我々は以前の研究で、チオール酸化酵素 *ERV1* 遺伝子の高発現が、酸化型グルタチオン（GSSG）および還元型グルタチオン（GSH）を含めた総グルタチオンの生産量を向上させることを明らかにした。その後我々は、このチオール酸化酵素をアミノ酸置換し、グルタチオンに対する活性を向上させた変異酵素を作成するとともに、これらの変異酵素遺伝子を高発現させることで、*S. cerevisiae* 内でのグルタチオン生産をさらに向上させた。本大会ではこれらの知見について報告する。
【実験】インバース PCR 法により、Erv1 タンパク質の活性部位（C30, C33, C130, C133）に隣接する残基を置換した変異酵素遺伝子を 14 種類作成し、それらの遺伝子を pET-22b ベクターを用いて大腸菌 Rosetta™(DE3)pLysS 内で発現させ、遺伝子産物を金属アフィニティーカラムで均一に精製した。精製したタンパク質を 10 mM GSH およびγ-グルタミルシステイン（γ-GC）を含む 20 mM りん酸緩衝液(pH 7.0)内で、30℃、10 分間反応させ、その生成物を HPLC で定量した。また、Erv1 およびその変異酵素遺伝子を発現用プラスミド pGK406 に挿入し、それらを酢酸リチウム法で *S. cerevisiae* GCI Δ*GLR* 株に導入した。得られた株を YPD 培地を用いて 30℃、150 rpm で 48 時間培養し、細胞内の GSH および GSSG を HPLC で定量した。
【結果と考察】$Erv1^{S32A}$, $Erv1^{S32T}$, $Erv1^{N34A}$はErv1より効率的にGSHを酸化した（相対活性: $Erv1^{S32A}$;169±6%, $Erv1^{S32T}$;178±7%, $Erv1^{N34A}$;201±7%）。また、これらの変異を同時に導入した変異酵素を作成し、同様にGSHに対する活性をそれぞれ測定したところ、さらにGSHに対する活性の高い変異酵素が得られた（相対活性: $Erv1^{S32A/N34A}$;240±11%, $Erv1^{S32T/N34A}$;196±7%）。Erv1タンパク質の構造から、S32およびN34はそれぞれ周辺の残基と水素結合を形成していると考えられる。また、これらの変異酵素はGSHの前駆体で、より低分子のγ-GCへの活性はErv1と変わらないことから、活性部位周辺の水素結合が失われ、柔軟性が増したことにより、嵩高いGSHが立体的な阻害を受けにくくなったと考えられる。これらの変異酵素遺伝子を*S. cerevisiae*内で高発現させた結果、$ERV1^{S32A}$発現株が最もGSSGの収率が高く、ERV1発現株の約1.5倍、野生株の約2倍だった。

*Saccharomyces cerevisiae*, glutathione, Thiol oxidase

講演番号：4C23a12
講演日時：3 月 20 日 12:15～ C 校舎 23 会場

*Saccharomyces cerevisiae* による 1,2,4-ブタントリオール生産技術の開発
Production of 1,2,4-butanetriol in *Saccharomyces cerevisiae* through metabolic engineering
○番場 崇弘[1]、蓮沼 誠久[2]、近藤 昭彦[2] ([1]神戸大院・工学、[2]神戸大院・科学技術イノベーション)
○Takahiro BAMBA[1], Tomohisa HASUNUMA[2], Akihiko KONDO[2] ([1]Kobe Univ. Engineering, [2]Kobe Univ. Science, Technology and Innovation)

1,2,4-ブタントリオールトリナイトレート（BTTN）は、トリニトログリセリンの代替品として火薬等としての利用が期待されており、衝撃や熱に対する安定性が高い等、ニトログリセリンより優れた性能を持っている。BTTN の合成前駆体である 1,2,4-ブタントリオール（BT）は、マレイン酸エステルの還元により工業生産されているが、副生成物の生成、高温・高圧条件での反応等、問題が多い。そこで、より穏和な反応条件で副生成物も少ない微生物による BT の生産方法が検討されてきた。具体的には、大腸菌を用いて、キシロースやアラビノースを原料とした生産が報告されている。

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、大腸菌と比べて頑強な細胞構造を有し、ストレス耐性が高いことから、工業スケールでの物質生産に向いていると考えられている。しかしながら、これまでに *S. cerevisiae* による BT 生産の報告例はない。そこで本研究では、*S. cerevisiae* の染色体に、*Caulobacter crescentus* 由来キシロースデヒドロゲナーゼ遺伝子（*xylB*）およびキシロネートデヒドロターゼ遺伝子（*xylD*）、*Pseudomonas putida* 由来 2-ケト酸デカルボキシラーゼ遺伝子（*mdlC*）を 1 コピーずつ導入した試作株 tsBD-mdlC を作出し、キシロースからの BT 生産を試みた。tsBD-mdlC は 10 g/L のキシロースから 31.6 ± 1.9 mg/L の BT を生産したが、中間生成物のキシロン酸が培地中に多く（7.6 ± 0.4 g/L）存在していた。キシロン酸は、キシロネートデヒドロターゼと 2-ケト酸デカルボキシラーゼにより 3,4-ジヒドロキシブタナールに変換され、続いてアルコールデヒドロゲナーゼにより BT に変換される。そこで、キシロン酸以降の代謝経路を強化するため、*xyl*D の多コピー導入による過剰発現を行った。次に、強力な *TDH3* プロモーターの下流に連結した *Lactococcus lactis* 由来の 2-ケト酸デヒドロゲナーゼ遺伝子（*Kivd*）を 2 コピー導入することで、tsBDδD-2tKivd を作出した。tsBDδD-2tKivd は 10 g/L のキシロースから 815.5 ± 44.0 mg/L の BT を生産して、試作株に比べ約 26 倍の BT 生産量の向上が見られた。

*Saccharomyces cerevisiae*, 1,2,4-Butanetriol, Xylose

発表責任者：番場崇弘（121t454t@stu.kobe-u.ac.jp）

講演番号：4C24a01
講演日時：3 月 20 日 09:20～ C 校舎 24 会場

ストレス応答に関連する *Moniliella megachiliensis* 由来 *transketolase* の機能役割
Complementary function of two transketolase isoforms from *Moniliella megachiliensis* in relation to stress response

○岩田 悠志[1]、伏屋 瑞季[2]、安彦 良祐[1]、渡邉 泰祐[1,2]、荻原 淳[1,2]、春見 隆文[1,2]（[1]日大生資科・生命化、[2]日大院生資研究科・生資利用）
○ Hisashi IWATA[1], Mizuki FUSHIYA[2], Ryosuke ABIKO[1], Taisuke WATANABE[1,2], Jun OGIHARA[1,2], Takafumi KASUMI[1,2] ([1]Dept.Chem.Life.Sci.,Nihon Univ, [2]Dept. Biores. Util. Sci., Grad. Sch. Biores. Sci., Nihon Univ)

担子菌系酵母 *Moniliella megachiliensis* は、高糖濃度条件下で適合溶質として主にエリスリトールを生成する。エリスリトールは、低カロリー性や保湿性などの機能特性から食品や化粧品等に利用されているが、近年では、それらに加えてバイオ樹脂など化成品の原料としての用途も期待されている。エリスリトール生成には数多くの酵素系が関与するが、中でもペントースリン酸経路の Transketolase (TKL)が重要な役割を果たしていることを、トランスクリプトーム解析により推定した (荻原ら、日本応用糖質科学会 2016 年度大会講演)。そこで、ストレス環境下での *TKL* の発現動態、機能解析を行い、本菌におけるエリスリトール生成との関連性を明らかにすることを目的とした。

全ゲノム配列から本菌には 2 つの isogene (*MmTKL1*, *MmTKL2*)が存在することを確認し、その配列を解析した結果、両遺伝子には 72%の相同性があり、担子菌類と 60%以上の高い相同性を示した。それらの遺伝子は 5'上流域に浸透圧ストレス応答に関与する領域 (STRE)をもつ *MmTKL1* と、酸化ストレス応答に関与する領域 (AP-1)をもつ *MmTKL2* であることが分かった。また、宿主 *Saccharomyces* による異種発現系において、芳香族アミノ酸合成の機能補完を示したのは MmTKL1 ではなく、MmTKL2 であった。本菌における短時間の浸透圧ストレス応答 (20%グルコースまたは 1.2 M NaCl)では、*MmTKL1* の発現がストレス負荷後に時間経過と共に増大した。一方、*MmTKL2* は、ストレス負荷に関わらず常時一定の発現を示した。この時の細胞内エリスリトール蓄積量は、*MmTKL1* の発現量と相関性を示した。また、短時間の酸化ストレス応答（0.15 mM Menadione）では、浸透圧ストレスで変動を示さない *MmTKL2* の発現量が、ストレス負荷後から時間の経過と共に増大したが、*MmTKL1* の発現量は、*MmTKL2* に比較して非常に低いレベルであった。この時の細胞内エリスリトール蓄積量は、*MmTKL2* の発現量と相関性を示した。20%グルコースによる長時間の浸透圧ストレス応答について解析したところ、細胞内エリスリトール蓄積量は、*MmTKL1* の発現量と強い相関があるが、*MmTKL2* にも一定の相関性があるように見受けられた。

以上の結果から、本菌が有する 2 つの transketolase は異なる環境ストレス (浸透圧、酸化)に応答してエリスリトール生合成を行う際に、互いに補完的な役割を果たすと推定された。

Stress response, Transketolase, Erythritol

発表責任者：岩田悠志（iwata.hisashi@nihon-u.ac.jp）

講演番号：4C24a02
講演日時：3 月 20 日 09:35～ C 校舎 24 会場

*Candida versatilis* SN-18 におけるマンニトール代謝機構の解明
Mechanism of mannitol metabolism in *Candida versatilis* SN-18

○伏屋 瑞季[1]、水島 大貴[1,3]、土田 真由[2]、岩田 悠志[2]、渡邉 泰祐[1,2]、荻原 淳[1,2]、春見 隆文[1,2] ([1]日大院生資研究科・生資利用、[2]日大生資科・生命化、[3]農研機構・食品研究部門)
○Mizuki FUSHIYA[1], Daiki MIZUSHIMA[1,3], Mayu TSUCHIDA[2], Hisashi IWATA[2], Taisuke WATANABE[1,2], Jun OGIHARA[1,2], Takafumi KASUMI[1,2] ([1]Dept. Biores. Util. Sci., Grad. Sch. Biores. Sci., Nihon Univ, [2]Dept.Chem.Life.Sci.,Nihon Univ, [3]NFRI,NARO)

浸透圧耐性酵母である *Candida versatilis* SN-18 は高糖濃度(20%グルコース)条件下で著量のグリセロールを生産する。我々は *Candida versatilis* SN-18 の発酵によるグリセロールの生産に着目し、研究を行ってきた。しかし、本菌がグリセロール生産条件においてグリセロールと同等かそれ以上のマンニトールを生産することが明らかになったことから、新たに *Candida versatilis* SN-18 のマンニトールの生産に着目した。マンニトール生成経路は、*Aspergillus niger* において研究されており、解糖系の中間代謝産物であるフルクトース-6-リン酸 (F-6-P) を出発物質として、Mannitol-1-phosphate dehydrogenase (MPD) によってマンニトール-1-リン酸へと還元された後に脱リン酸化し、生成する経路と、F-6-P が脱リン酸化し、生成したフルクトースが Mannitol dehydrogenase (MDH) によって還元されて生成する 2 つの経路が報告されている。本菌においてはこれまでに、MPD は発現していない可能性があること、また、MDH が本菌におけるマンニトール生成に明らかに関与していることを確認した（伏屋ら、2016 年度日本応用糖質科学会講要)。そこで今回は、*C. versatilis* のドラフトゲノム情報を用いて MDH の完全長を取得した。その結果、一部の細菌類の MDH との相同性が見られたが、真菌類の近縁種とは明らかに異なる配列を有していることが判明した。*C. versatilis* SN-18 の MDH は真菌類の中では特殊な配列を有すると考えられた。*Saccharomyces cerevisiae* を用いた異種発現を行い、取得した MDH 配列の機能解析を行った。また、マンニトール生産条件における MDH 遺伝子の発現量解析を行った。

マンニトール生成の生理学的意義については、細胞内の酸化還元バランスの調整機能や、高浸透圧条件下、病原性のある種では宿主への感染時に生成される防御的機能が知られている。そこで対数増殖期の細胞に浸透ストレス、酸化ストレスを短時間（1hr）負荷し、マンニトール蓄積量、MDH 活性を測定した。浸透圧ストレス条件下ではマンニトール蓄積量は MDH 活性とともに減少する傾向が見られた。酸化ストレス条件下ではストレス剤によって異なる傾向を示し、$H_2O_2$ 添加時にはマンニトール蓄積量が減少するのに対し、MDH 活性は増加する傾向が見られた。一方、Menadion 添加時にはマンニトール蓄積量は MDH 活性とともに増加する傾向が見られた。このことからマンニトール生成には細胞内の活性酸素種 (ROS) の蓄積が関係しているのではないか考えられた。そこでマンニトール生産条件、浸透ストレス、酸化ストレス条件下における細胞内 ROS 蓄積量を測定した。これらの結果について報告する。

mannitol, mannitol dehydrogenase, stress response

講演番号：4C24a03
講演日時：3 月 20 日 09:50～ C 校舎 24 会場

# 代謝改変シアノバクテリアによるソルビトールの光合成生産

# Metabolic Engineering of Cyanobacteria for Photosynthetic Production of Sorbitol

○陳 泰駿、奥田 裕紀子、池内 昌彦（東大・院総合文化）
○Taejun CHIN, Yukiko OKUDA, Masahiko IKEUCHI (Grad. Sch. Arts Sci., Univ. Tokyo)

近年、地球温暖化や化石資源枯渇などの環境・資源問題がクローズアップされている。その解決策として、光合成による $CO_2$ を原料とした物質生産が重要であり、中でも光合成微生物シアノバクテリアを物質生産に応用する研究が注目されている。特に、炭酸固定反応であるカルビン回路から作られる糖は、生物のエネルギー源や様々な工業製品の原料となる物質である。そのような汎用性の高い糖をシアノバクテリアで積極的に生産することは、光合成の物質生産に関する理解を深めてその応用性を評価する上で重要だと考えられる。本研究では、生産させる糖としてソルビトールに着目した。リンゴなどのバラ科果樹の糖蜜に多く存在するソルビトールは、甘味料や保湿剤など多様な原料として利用されている。化学的触媒による工業生産や組み換え微生物による発酵生産もなされているが、化学的触媒の使用は環境・資源問題に悪影響を懸念され、微生物による発酵生産では発酵基質や培養制御の問題点があり、その応用が妨げられている。そこで本研究では、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 にソルビトール生合成能を付与し、ソルビトールを光合成生産してその応用性を評価することを目的とした。

まず、リンゴ由来 NADPH 依存型ソルビトール-6-リン酸脱水素酵素(*s6pdh*)遺伝子を 6803 株に導入し、適切な細胞濃度にてテオフィリン誘導的に S6PDH を発現させて培養した。結果、シアノバクテリアによるソルビトール生産(106 mg/L)に初めて成功したが、誘導後に著しく細胞が死滅する現象が見られた。S6PDH 反応の基質グルコース-6-リン酸(G6P)または NADPH の減少が致死的な増殖阻害の原因だと考えた。そこで、炭素源と還元力の供給量の増強がソルビトール生産 6803 株に与える影響を検討した。炭素フラックス強化においては、カルビン回路の律速酵素でフルクトース-6-リン酸(F6P)を生じる、フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ(FBPase)に着目した。還元力増強では、膜内外の $H^+$ 濃度勾配で NADPH を生成するトランスヒドロゲナーゼ(PntAB)に着目し、各酵素をソルビトール生産 6803 株にてそれぞれ過剰発現させた。結果、致死的な増殖阻害が緩和して細胞が維持され、継続的なソルビトール生産を行えるようになった(202 mg/L)。FBPase による F6P および G6P への炭素フラックス強化と PntAB による NADPH 供給量の増強が、ソルビトール生産 6803 株における菌体維持とソルビトール生合成を共に補強できたのかもしれない。本研究では、カルビン回路強化と還元力増強でシアノバクテリアの光合成生産能を向上させる可能性を議論したい。

cyanobacteria, sorbitol, engineering

講演番号：4C24a04
講演日時：3 月 20 日 10:05～ C 校舎 24 会場

# *Bifidobacterium longum* 105-A のメチオニン利用に関与する遺伝子の発現解析および遺伝子破壊による検証

# Expression and knock-out analysis of genes involved in methionine utilization in *Bifidobacterium longum* 105-A

○和田 大[1]、松本 菜々恵[1]、小松 一喜[1]、阪中 幹祥[2]、松尾 実紀[1]、吹谷 智[1]、横田 篤[1]（[1]北大院農、[2]石川県大）
○Masaru WADA[1], Nanae MATSUMOTO[1], Kazuki KOMATSU[1], Mikiyasu SAKANAKA[2], Miki MATSUO[1], Satoru FUKIYA[1], Atsushi YOKOTA[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Ishikawa Pref. Univ.)

【背景と目的】ビフィズス菌の保健効果についての報告は多いが，硫黄代謝および含硫アミノ酸代謝に関する知見は少ない。ビフィズス菌は腸管内に棲息し，有機硫黄源としてシステイン (Cys) を要求すると考えられてきたが，*Bifidobacterium longum* 105-A 株を含む一部の菌株では，Cys の代わりにメチオニン (Met) を単一硫黄源として生育可能であり，Met を Cys へ代謝する逆流硫黄経路を持つことが示された(1)。本研究では，RNA-seq により Met を単一硫黄源とする場合に発現誘導される遺伝子を解析した後，*S*-アデノシルメチオニン (SAM) 回路に着目し，遺伝子破壊実験およびプラスミドによる相補実験を行った。

【方法と結果】*B. longum* 105-A 株を，Cys および Met をそれぞれ単一硫黄源とする最少培地で培養し，回収した各菌体から RNA を抽出した後，RNA-seq で遺伝子の発現量を網羅的に解析した。その結果，逆流硫黄経路遺伝子の多くは，Met を単一硫黄源とする場合に発現量が増大することが明らかになった。このことから，本株の逆流硫黄経路遺伝子は Met により発現が誘導される可能性が示唆された。さらに，*B. longum* 105-A 株を親株として，SAM 回路遺伝子であるアデノシルホモシステイナーゼ (AhcY) をコードする *ahcY* と *S*-リボシルホモシステインリアーゼ (LuxS) をコードする *luxS* の単独欠損株，二重欠損株および相補株を平山らの方法(2)で作成した。各株を Cys および Met をそれぞれ単一硫黄源とする最少培地で培養したところ，Cys では野生株と変異株の生育に明確な差はなく，Met では *luxS* 欠損株および二重欠損株の生育が大幅に低下した。一方，*ahcY* 欠損株は野生株と同程度の生育を示した。また，*luxS* 相補株の生育は野生株並みに回復した。これらの結果から，本株の Met 利用において SAM 回路が重要な役割を果たしていること，AhcY よりも LuxS が SAM 回路で主に機能していることが示唆された。

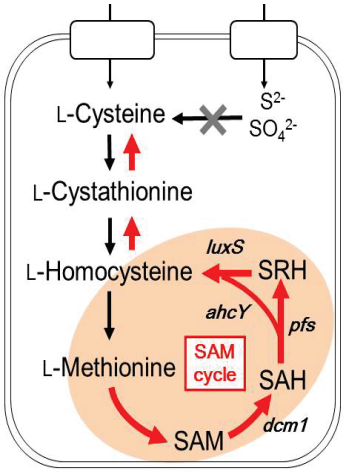



**Fig.** Cys/Met metabolism in *B. longum* 105-A.
SAM, *S*-adenosylmethionine; SAH, *S*-adenosylhomocysteine; SRH, *S*-ribosylhomocysteine.

(1) 鈴木ら，2014 年度日本農芸化学会，講演番号 : 3A15p17
(2) Hirayama Y, Sakanaka M, Fukuma H, Murayama H, Kano Y, Fukiya S, Yokota A. Appl. Environ. Microbiol. **78**:4984-4994 (2012)

bifidobacteria, RNA-seq, *S*-adenosylmethionine cycle

発表責任者：和田　大（wada@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：4C24a05
講演日時：3 月 20 日 10:20～ C 校舎 24 会場

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来 isopropylmalate synthase のアシル化修飾による活性制御機構の解析
Regulation of isopropylmalate synthase from *Thermus thermophilus* via protein acylation
○吉田 彩子[1]、吉田 稔[2]、古園 さおり[1]、西山 真[1] ([1]東大・生物工学セ、[2]理研・CSRS)
○Ayako YOSHIDA[1], Minoru YOSHIDA[2], Saori KOSONO[1], Makoto NISHIYAMA[1] ([1]BRC, UTokyo, [2]CSRS, RIKEN)

【目的】ロイシン生合成の初発酵素である 2-isopropylmalate synthase（IPMS）は、2-oxoisovalerate とアセチル CoA の縮合反応を触媒し、最終産物であるロイシンによってフィードバック阻害を受けることが知られている。ロイシンは重要な生体調節因子として機能することから、IPMS はその量を調節するスイッチとして注目される。我々は、これまでに高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB27 を対象としたプロテオミクス解析を行い、IPMS である TTC0849 がアセチル化及びスクシニル化修飾を受けることを明らかにしている。この結果は IPMS が細胞内のロイシン濃度だけでなく、アシル CoA 濃度に応じたアシル化修飾によってもその活性が制御されることを示唆している。タンパク質のアセチル化には KAT（Lysine acetyltransferase）が関わる酵素的なアセチル化と、アセチル CoA やアセチルリン酸による化学的（非酵素的）なアセチル化が知られ、脱アセチル化は KDAC（Lysine deacetylase）が担うとされる。アセチル化の基質にアセチル CoA が、KDAC のうち sirtuin 型の酵素は $NAD^+$が用いられることから、これらの鍵代謝産物の濃度を指標として代謝状態に応答したタンパク質のアセチル化レベルの制御が存在し、それによってタンパク質の機能が調節されることが示唆されている。そこで今回は、IPMS のアセチル化機構及び脱アセチル化機構について明らかにすることを目的とした。
【結果】*T. thermophilus* の KAT ホモログである TTC1711 や、KAT に共通して存在する GNAT モチーフを持ち IPMS と同一クラスターに存在する TTC0848 を用いて、アセチル CoA やスクシニル CoA と反応させたところ、IPMS の KAT 依存的なアセチル化及びスクシニル化修飾は観察されなかった。このことから、IPMS の KAT の同定には至っておらず、IPMS が他の KAT によってアセチル化される可能性と共に、IPMS が非酵素的にアセチル化・スクシニル化される可能性が考えられた。次いで、非酵素的にアセチル化した IPMS を *T. thermophilus* の持つ 3 つの KDAC ホモログ（TTC0104、TTC1026、TTC1954）と反応させたところ、TTC0104 でのみ脱アセチル化反応が進行したことから、TTC0104 が IPMS の KDAC として働くことが示唆された。さらに、アセチル CoA によって非酵素的にアセチル化した IPMS と TTC0104 による反応により脱アセチル化した IPMS について、アセチル化部位を LC-MS/MS により同定し、その比較により TTC0104 の脱アセチル化反応の基質となるアセチル化部位を同定した。現在、KDAC の基質となるアセチル化部位の活性への影響を検討中であり、IPMS のアセチル化レベルの制御及びそれによる活性制御機構について報告する予定である。

Leucine biosynthesis, Protein acylation, *Thermus thermophilus*

発表責任者：西山　真（umanis@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4C24a06
講演日時：3 月 20 日 10:35～ C 校舎 24 会場

納豆菌によるオロト酸生産のための *pyrE* 破壊遺伝子の構築
Constraction of the disrupted *pyrE* gene of *Bacillus subtilis natto* for hyper production of orotic acid
○七尾 圭香、袴田 佳宏、大箸 信一（金沢工業大学ゲノム生物工学研究所）
○Keika NANAO, Yoshihiro Hakamada, Shinichi Ohashi (Genome Biochemical. Lab., Kanazawa Inst Technol.)

【目的】
オロト酸はウラシル生合成経路(UMP 生合成経路)の代謝中間体物質であり、これまでに医薬品に配合されるなどヒトにとって効果効能が認められている物質である。現在多くのオロト酸は、尿素とオキサロ酢酸エステルとの有機合成反応で生産されている。微生物発酵生産法として、一般的に枯草菌(*Bacillus subtilis*)が知られている。しかし、有機合成法に比べて生産性の低さが現状である。本研究では、納豆菌によるオロト酸の高生産化を検討するため、遺伝子工学の手法を用いて UMP 生合成経路の一員であるオロト酸ホスホリボシルトランスフェラーゼの遺伝子 *pyrE* の破壊を行った。
【方法】
遺伝子破壊プラスミドの構築は、目的遺伝子 *pyrE* を *cat* 遺伝子に組換えて行った。オロト酸低生産納豆菌（*B. subtilis natto* KIT1205）のゲノムを鋳型にして、nested PCR によって目的遺伝子（*pyrE* を含む上流・下流各 1.0 kbp 含む）2.7 kbp の DNA 断片を得た。これを大腸菌と枯草菌のシャトルベクターpHY300PLK（4.87 kbp）の *Bam*HI・*Xba*I サイトにクローニングした。取得したキメラプラスミド pHY*pyrE* を鋳型とし inverse PCR を行い、*Nde*I・*Sac*I サイト *cat* を導入した（pHY*pyrE*::*cat*）。
納豆菌のプロトプラスト法による形質転換では、溶菌が生じやすいため、リゾチーム処理条件、および再生培地組成を検討することで溶菌を抑制できるか検討した。
【結果】
pHY300PLK と *pyrE* DNA 断片の ligation mixture を用いて、ヒートショック法により *E. coli* HST08 を形質転換した結果、得られた形質転換体からキメラプラスミド pHY*pyrE* を取得できた。pHY*pyrE* を鋳型に inverse PCR を行い得られた DNA 増幅断片と予め PCR で増幅した *cat* の ligation mixture を用いて *E. coli* HST08 を形質転換した結果、Amp および Cm 耐性を有する形質転換体を取得できた。得られた形質転換体からプラスミドを回収し、ベクター側のプライマーと *CAT* 遺伝子内のプライマーを用いて PCR を行った結果、目的の遺伝子断片の増幅（約 2.1 kbp）が認められた。納豆菌のプロトプラストを用いた形質転換では、リゾチーム濃度を 30 mg/mL とし再生培地組成に大豆の煮汁を用いることで、溶菌を抑制できた（$1.43\times10^2$ cfu/μg）。以上のことにより、pyrE 破壊用キメラプラスミドの構築および納豆菌の形質転換法が確立したので、今後は形質転換効率を上げることが重要と考えられた。

Bacillus natto, Orotic acid, Disrupted gene

発表責任者：七尾圭香（b1208023@planet.kanazawa-it.ac.jp）

講演番号：4C24a07
講演日時：3 月 20 日 11:00～ C 校舎 24 会場

大腸菌におけるエネルギー代謝の切り替え機構
Mechanism for energy metabolic transition in a bacterium *Escherichia coli*
○島田 友裕、田中 寛（東工大・化生研）
○Tomohiro SHIMADA, Kan TANAKA (TITech)

代謝系は全ての生物に普遍性が高く、自在にその流れを変えながら、様々な局面で重要な生命現象を引き起こしている。しかし、代謝制御に関わる知見が蓄積した今日でも、代謝フローの方向性を細胞が操る機構は明確でなく、任意の人為操作が可能となる目処も立っていない。私たちは研究の背景となる情報に富んだ大腸菌を材料とし、代謝フローの転換を引き起こす分子機構の「枠組み」を明らかにすることを目的として研究を進めている。

これまでの研究で、グルコースを主要な炭素源とした最小培地でのバッチ培養系を用い、エネルギー代謝ステート（Energy Metabolic States）が順次遷移していく実験系を確立した。さらに、グルコース酸化により解糖系を中心にエネルギーを獲得する代謝ステート（State I）から、酢酸やアミノ酸を利用して TCA を中心にエネルギーを獲得する代謝ステート(State II)への切り替えの際に Acetyl-CoA を酢酸へ変換する代謝ステート(Metabolic Transition State)が存在する事を発見した。

本発表では、その分子機構の解明について得られてきた結果を報告する。Phosphate acetyltransferase（*pta*）または Acetate kinase（*ackA*）を欠損させると Metabolic Transition State において、細胞増殖が著しく停滞することが観察された。Pyruvate dehydrogenase（PDH）または 2-Oxoglutarate dehydrogenase（OGDH）の特定のサブユニットを過剰発現させることで増殖の停滞が部分的に回復した。そこで、これら二つの酵素の活性を経時的に測定したところ、野生株では Metabolic Transition State を境に PDH 活性が低下し、OGDH 活性が上昇していたが、*pta* 欠損株においては PDH 活性が低下しない一方で、OGDH 活性が増殖停滞の間に上昇していた。これらの事から PDH に対する OGDH の活性比が一定以上になることが State II への遷移を規定している事が示唆された。また、Phosphotransferase System の一つ、PtsN のリン酸化レベルが State I から State II の遷移に合わせて上昇し、二つの酵素の活性制御に関与している事を示唆する結果を得た。さらに、野生株において PDH（AceEF-Lpd)および OGDH(SucAB-Lpd)の各サブユニットの細胞内濃度を観察したところ、Metabolic Transition State の前後では顕著な発現量の変化は観察されなかったが、Lpd の複合体形成相手は AceEF から SucAB へと遷移していた。これらの結果から、エネルギー代謝遷移を引き起こすための分子機構、およびその生理的な意義について議論したい。

Energy Metabolic Transition, Pyruvate dehydrogenase, 2-Oxoglutarate dehydrogenase

講演番号：4C24a08
講演日時：3 月 20 日 11:15～ C 校舎 24 会場

# キヌレニンアミノトランスフェラーゼの遺伝子破壊による出芽酵母キヌレン酸欠乏株の構築

# Construction of kynurenic acid deficient budding yeast strains by deletion of kynurenine aminotransferase genes

○大橋 一登 (群馬大学)
○Kazuto Ohashi (Gunma Univ.)

**【背景】** キヌレン酸はトリプトファンの主要な代謝経路であるキヌレニン経路で生合成される。キヌレニン経路は $NAD^+$の *de novo* 生合成経路として知られている。その一方で、いくつかのキヌレニン経路の代謝物は生理活性を有することも知られており、特にキヌレン酸は高等生物特有の受容体に作用し、抗炎症、抗潰瘍、摂食調節作用などを示すことが報告されている。キヌレン酸は高等生物だけでなく、原核微生物や出芽酵母などの単細胞生物でも生合成されており、生物間に共通の機能を有すると考えられる。なお、キヌレン酸は活性酸素種の捕捉剤であると言われている。しかし、これまでの実験で、キヌレン酸は出芽酵母の活性酸素種への耐性にほとんど寄与しなかった。キヌレン酸の出芽酵母における機能はよく分かっていない。

**【目的】** キヌレン酸はトリプトファンから合成されたキヌレニンがキヌレニンアミノトランスフェラーゼ（KAT）で脱アミノ化されることで合成される。KAT などのアミノトランスフェラーゼは特定のアミノ酸（キヌレニンなど）から 2-オキソグルタル酸などの有機酸へアミノ基を転移させるが、アミノ酸への基質特異性が異なるにもかかわらず、それぞれ一次構造の相同性が高い。そのため、一次構造によるキヌレニンへの基質特異性の判断が困難であり、出芽酵母の KAT は未だに特定されていない。本研究ではキヌレン酸の細胞内での機能を調べるために、KAT 遺伝子の同定とその破壊によるキヌレン酸欠乏株の構築を試みた。

**【結果】** 液体クロマトグラフィー質量分析（LCMS）を用いて、出芽酵母から抽出したキヌレニンとキヌレン酸を定量する実験系を確立した。また、ヒトの KAT と相同性を示す酵素を選出し、それらの遺伝子欠損株からキヌレニンとキヌレン酸を抽出し、LCMS で測定した。その結果、Aro9 の遺伝子欠損株のみ、キヌレニンに対するキヌレン酸の比が野生株より減少していた。この結果から、Aro9 が KAT 活性を有すると考えられたが、Aro9 遺伝子欠損株ではキヌレン酸は枯渇していなかった。このことから、他にも KAT 反応を触媒する酵素が存在し、出芽酵母の KAT は複数存在すると考えられた。そこで、新たに Aro9 と高い相同性を示す酵素に着目し、三つの酵素 Aro8、YER152c、および Bna4 を KAT 候補として選出した。そして、Aro8、YER152c、Bna4 の順にこれらの遺伝子破壊を Aro9 遺伝子欠損株に導入した。これらの KAT 候補遺伝子多重破壊株からキヌレニンとキヌレン酸を抽出し、LCMS で測定したところ、どの破壊株でもキヌレン酸は枯渇していなかった。しかしながら、キヌレニンに対するキヌレン酸の比が顕著に減少していることが確認できた。

kynurenic acid, kynurenine, Saccharomyces cerevisiae

発表責任者：大橋一登（ohashi@gunma-u.ac.jp）

講演番号：4C24a09
講演日時：3 月 20 日 11:30～ C 校舎 24 会場

海洋性エチレン資化性菌の Epoxyalkane Coenzyme M Transferase (EaCoMT)
Epoxyalkane Coenzyme M Transferase (EaCoMT) in marine ethylene assimilating bacteria
○鈴木 竜大郎[1]、鈴木 敏弘[3]、羽部 浩[2]、布施 博之[4] ([1]芝工大院　シ、[2]産総研　環境管理、[3]東京農大　応用生物、[4]芝工大　生命)
○Ryutaro SUZUKI[1], Toshihiro SUZUKI[3], Hiroshi HABE[2], Hiroyuki HUSE[4] ([1]Graduate School of Systems Engineering and science, Shibaura Institute of Technology, [2]National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, [3]Tokyo University of Agriculture, [4]Shibaura Institute of Technology)

【背景と目的】エチレンやプロピレン等のアルケン化合物は、化学工業分野において多く利用されている。また、海洋中では主に藻類や光合成バクテリアなどにより生産され、海洋生態系への影響を及ぼしていると考えられている。アルケンは、アルケン資化性菌の持つアルケン代謝経路において、初発酸化酵素によりエポキシ化され、生じたエポキシアルカンは Epoxyalkane Coenzyme M Transferase (EaCoMT)により Coenzyme M (CoM)が付加されることが報告されている。本研究室では海洋性アルケン資化性菌としてエチレン資化性菌 ETY-M 株、ETY-NAG 株、ETY-TS 株およびプロピレン資化性菌 PE-08W 株を海洋から単離し、エチレン資化性菌は初発酸化酵素として Cu-MMO の遺伝子を持っていることを報告してきた。エチレン資化性菌のドラフトゲノムの解析の結果、ETY-M 株および ETY-NAG 株は 2 つの EaCoMT 遺伝子を保持していることが明らかになり、ETY-TS 株も 2 つの遺伝子を持っていると推定された。そこで、本研究ではそれらについての研究を行った。
【方法と結果】ドラフトゲノムより ETY-M 株および ETY-NAG 株の 2 つの EaCoMT 遺伝子の配列を決定した。ETY-M 株の 2 つの EaCoMT 遺伝子は 1113 bp と 1116 bp でアミノ酸での相同性は 98 %であった。ETY-NAG 株の 2 つの EaCoMT 遺伝子は 1152 bp と 1146 bp でありアミノ酸での相同性は 98 %であった。ETY-M 株の 2 つの EaCoMT 遺伝子の転写について、エチレンおよび対照として酢酸ナトリウムにて生育させ、RT-PCR(逆転写 PCR)により両遺伝子の転写を確認した。また ETY-M 株の 2 つの EaCoMT の活性を確認するために、菌株より 2 つの EaCoMT 遺伝子を大腸菌にて発現させた。ベクターは pET15b を使用し N 末端側に His タグが付く形で EaCoMT 遺伝子を導入した。大腸菌は、DNA クローニングには *E. coli* DH5α 株を、発現には E. *coli* BL21(DE3)株を使用した。ガスクロマトグラフィーを使用した基質であるエチレンオキシドの減少と SDS-PAGE により ETY-M 株の 2 つの EaCoMT の発現を確認した。現在、海洋性エチレン資化性菌 ETY-NAG 株の 2 つの EaCoMT 遺伝子の発現と活性確認を、ETY-TS 株ではドラフトゲノムから EaCoMT 遺伝子の解析を行っている。

【参考文献】1)Suzuki et. al., (2012) Microbes Environ 27:54-60
2)2014 年環境微生物系学会合同大会

Epoxyalkane Coenzyme M Transferase, Ethylene

講演番号：4C24a10
講演日時：3 月 20 日 11:45～ C 校舎 24 会場

# 大型褐藻を原料とした酵母発酵へ向けて：褐藻多糖アルギン酸由来モノウロン酸 DEH 資化能の適応進化による向上

# Toward the yeast fermentation based on a brown macroalgal resource: An improvement of the capacity to ferment DEH, a monouronic acid derived from alginate, a brown macroalgal polysaccharide, through an adaptive evolution

松岡 史也[1]、柏原 貴幸[1]、田中 秀樹[1]、佐薙 潤季[2]、橋本 渉[1,2]、村田 幸作[3]、○河井 重幸[1,2]（[1]京大院農、[2]京大農、[3]摂南大理工）
Fumiya MATSUOKA[1], Takayuki KASHIHARA[1], Hideki TANAKA[1], Hiroki SANAGI[2], Wataru HASHIMOTO[1,2], Kousaku MURATA[3], ○Shigeyuki KAWAI[1,2] ([1]Grad. Agric., Kyoto Univ., [2]Fac. Agric., Kyoto Univ., [3]Fac. Sci. Eng., Setsunan Univ.)

【背景と目的】広大な管轄水域を有する我が国にとって、国産可能な海洋バイオマス（大型褐藻）を原料とした有用化合物の発酵生産は有望な技術である。これにより、藻場効果による海洋資源の涵養や水産業の振興などの相乗効果も期待できる。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は有用化合物生産に優れた微生物であるが、大型褐藻の主要成分である褐藻糖質（アルギン酸とマンニトール）を資化できない。しかし、米国グループ [*Nature* 505:239-243 (2014)] ならびに我々は、アルギン酸由来 DEH とマンニトールを資化できる出芽酵母株（DEH+株）の構築に成功している。DEH は、エキソ型アルギン酸リアーゼによるアルギン酸の分解により生成するモノウロン酸である。さらに、DEH を唯一の炭素源とする合成培地（DEH 培地）を用いた適応進化により、DEH 資化能が向上した DEH++株も得ている。なお我々は、2 株の出芽酵母株（BY4742 株と D452-2 株）を宿主として DEH+株を構築し、両株由来の DEH++株を得ている。本発表では、DEH++株の性質と適応進化のメカニズムに関して発表する。

【結果】DEH+株および DEH++株による DEH の資化にはミトコンドリアの機能（呼吸）が必要であった。DEH++株による DEH からのエタノールの生産性も低かった。DEH++株（MATα）と親株（DEH を資化できない：MATa）を掛け合わせて 2 倍体化しても、DEH 資化能は大きく低下しなかった。即ちゲノム DNA への劣性の変異により DEH+株が DEH++株に進化したわけではないと考えられた。DEH 資化に必要な遺伝子（DHT1、A1-R’、KdgK、Eda の各遺伝子：コドンを最適化した上でプロモーター/ターミネーター間に挿入してゲノム DNA に導入することにより DEH+株を構築している）各々の DEH++株における転写量は、DEH+株における転写量とほぼ同程度であった。他方、両 DEH++株において、少なくとも A1-R’（DEH レダクターゼ）活性が DEH+株の同活性よりも上昇していた。この活性の上昇が、適応進化による DEH 資化能向上の原因の一つではないかと推察された。

yeast, alginate, evolution

発表責任者：河井重幸（kawais@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4C25a01
講演日時：3 月 20 日 09:20～ C 校舎 25 会場

# リンカー領域に規則性の高いアミノ酸配列を持った好熱性放線菌由来セルラーゼの酵素化学的解析
# Cloning, expression and characterization of a novel type endoglucanase containing tandem repeat sequence in linker region.

○松浦 愛奈[1]、堀江 瞳美[1]、河合 富佐子[2]、大田 毅[1]([1]県立広島大・生命環境、[2]京工繊大・繊科セ)
○Aina MATSUURA[1], Hitomi HORIE[1], Fusako KAWAI[2], Takeshi OHTA[1] ([1]Pu-hiroshima Univ., [2]KIT Univ.)

**【目的】**木質系・草木系バイオマスの結晶型セルロース資源化におけるセルロース低分子化技術は、機械的に細かくする「メカノケミカル処理」、150℃から 250℃の熱水中でリグノセルロースを分解する「水熱処理」など、物理・化学的に負荷の大きいものが中心である。これらと比較し「酵素糖化処理」は物理・化学的な負荷は小さく、また工業利用技術の観点からも耐熱・好熱性酵素のスクリーニングや酵素機能解析に期待が寄せられている。本研究では好熱性放線菌 *Thermobifida alba* strain AHK119 より新規セルロース分解酵素遺伝子をクローニングし、立体構造安定性が高いと考えられる酵素を見出すことで、経済性の高いセルロース分解法を開発することを目的とした。
**【方法】**新規セルラーゼ遺伝子の配列解析は、*Tb. alba* strain AHK119 ゲノムを鋳型に、合成プライマーを用いた PCR 法により行った。PCR 産物は pGEM-T easy vector へ TA クローニングし塩基配列を解析した。解析した塩基配列をアミノ酸に変換し、ExPASy proteomics server の Prosite を用いてタンパク構造中に含まれる domain 及び motif の検索を行った。さらに、得られた新規セルロース分解酵素遺伝子は、発現ベクターに pQE30 を、宿主菌には *Escherichia. coli* BL21 を用いて大腸菌発現系を構築した。酵素発現は IPTG 誘導により行い、リコンビナント酵素（N 末端 His-tag 融合型）は IMAC により精製し、酵素科学的解析を行った。
**【結果・考察】**BLAST による相同性検索の結果から、新規セルロース分解酵素は *Tb. alba* strain AHK119 由来 endoglucanase E5（AHK119-E5）であると考えられ、474 アミノ酸からなる、N 末端側に基質結合領域（CBM2）、C 末端側に触媒領域（GH5）を持ったタンパク質であった。これらの領域をつなぐリンカーは 32 アミノ酸残基で構成され、その配列は−GSDPGTDPGGPGTDPGGPGTDPGGPGTDPGAG−（GTP と PGGP のユニットが交互に）もしくは−GSDPGTDPGGPGTDPGGPGTDPGGPGTDPGAG−（PGTDPG のユニットが 4 回）の規則正しいタンデムリピートと捉えることもできる高い規則性を有していた。CMC を基質とした活性測定から AHK119-E5 は pH 9 付近に至適 pH をもつ弱アルカリ性の endoglucanase であり、さらに至適温度は 70℃付近と高く、80℃を超えても十分な活性を持つ好熱型酵素であることが示唆された。またセルロース粉末を基質とした酵素反応液上清より endoglucanase 活性が確認でき、exoglucanase 活性は得られなかったことから、不溶性基質分解物には可溶性を持つ重合度 2～12 のセロオリゴ糖が含まれる可能性が示唆された。AHK119-E5 はセルロース粉末に対して CMC と同程度以上の活性を示したことから、バイオエタノール生産において実用的な endoglucanase となる可能性が考えられた。

Cellulase, Tandem repeat sequence, Thermophilicity

発表責任者：大田　毅（t-ohta@ed.pu-hiroshima.ac.jp）

講演番号：4C25a02
講演日時：3 月 20 日 09:35～ C 校舎 25 会場

リンカー領域にパリンドロームなアミノ酸配列を持った好熱性放線菌由来マンノシダーゼの酵素化学的解析
Cloning, expression and characterization of a novel type mannan endo-1,4-beta-mannosidase containing palindromic linker region.
○堀江 瞳美[1]、松浦 愛奈[1]、河合 富佐子[2]、大田 毅[1]([1]県立広島大・生命環境、[2]京工繊大・繊科セ)
○Hitomi HORIE[1], Aina MATSUURA[1], Fusako KAWAI[2], Takeshi OHTA[1] ([1]Pu-hiroshima Univ., [2]KIT Univ.)

**【目的】**結晶セルロースがヘミセルロースやリグニンにより取り囲まれた複雑な構造を形成していることは、第二世代のバイオエタノールの効率的な生産を難しくしている課題のひとつである。ヘミセルロースは、マンノースやキシロース等の単糖を主成分とする多糖質であるが、直鎖高分子ではなく、枝を有すことで化学構造が複雑な多糖質となっており、これらを加水分解酵素により分解除去しようとすると非常に多くの種類の酵素が必要となる。本研究では、高い耐熱性とともにその他の耐性も有する好熱菌タンパク質から、新規ヘミセルロース分解酵素遺伝子をクローニングし、経済性の高いセルロース分解法に利用可能となる酵素の開発を目的とした。
**【方法】**新規ヘミセルラーゼ遺伝子の配列解析は、*Thermobifida alba* strain AHK119 ゲノムを鋳型に、合成プライマーを用いた PCR 法により行った。PCR 産物は pGEM-T easy vector へ TA クローニングし塩基配列を解析した。解析した塩基配列をアミノ酸に変換し、ExPASy proteomics server の Prosite を用いてタンパク構造中に含まれる domain 及び motif の検索を行った。さらに、得られた新規ヘミセルロース分解酵素遺伝子は、発現ベクターに pQE30 を、宿主菌には *Escherichia. coli* BL21 を用いて大腸菌発現系を構築した。酵素発現は IPTG 誘導により行い、リコンビナント酵素（N 末端 His-tag 融合型）は IMAC により精製し、酵素科学的解析を行った。
**【結果・考察】**BLAST による相同性検索の結果から、新規ヘミセルロース分解酵素は *Tb. alba* strain AHK119 由来 mannan endo-1,4-beta-mannosidase（AHK119-bMs）であると考えられ、454 アミノ酸からなる、N 末端側に触媒領域（GH5）、C 末端側に基質結合領域（CBM2）を持ったタンパク質であった。触媒領域と基質結合領域をつなぐリンカー領域は 30 アミノ酸残基で構成され、その配列は -GGSPGPTPDPTPDPTPDPTPDPDPGTEPGD-（15 アミノ酸残基）のパリンドロームもしくは TPDP ユニットのタンデムリピート（-GGSPGPTPDPTPDPTPDPTPDPDPGTEPGD-）と捉えることもできる、極めて高い規則性を有していた。LBG（ガラクトマンナン）を基質とした活性測定から、AHK119-bMs は pH10 付近に至適 pH をもつアルカリ性の beta-mannosidase であり、さらに至適温度は 70℃付近と高く、80℃を超えても十分な活性を持つ好熱型酵素であることが示唆された。また不溶性基質であるプロポール A（グルコマンナン）に対しても活性を示すことが確認された。触媒領域と基質結合領域のアミノ酸相同性はこれまでに報告のある beta-mannosidase と高い相同性があるにも関わらず AHK119-bMs は高い構造安定性が示唆されることからも、リンカー領域が酵素機能に影響している可能性が考えられた。

Cellulase, Palindromic, Thermophilicity

発表責任者：大田　毅（t-ohta@ed.pu-hiroshima.ac.jp）

講演番号：4C25a03
講演日時：3 月 20 日 09:50～ C 校舎 25 会場

# 放線菌メタロプロテアーゼ SCMP プロモーターの 5’領域の欠失はタンパク質生産性の向上をもたらす

# 5'UTR deletion of *Streptomyces cinnamoneus* metalloprotease promoter leads to enhance protein productivity

○裏地 美杉、万 クン、畑中 唯史（岡山生物研）
○Misugi Uraji, Kun Wan, Tadashi Hatanaka (RIBS, Okayama)

［目的］

*Streptomyces cinnamoneus* TH-2 株は、0.8%リン酸および 2%グルコースを含む PG 培地で培養すると、メタロプロテアーゼを大量に分泌する。そのメタロプロテアーゼ遺伝子の 425 bp 上流領域（SCMP プロモーター）は、非常に強力なプロモーターとして働くことから、放線菌の酵素発現系として商業利用もされている。本研究では、SCMP プロモーターの転写制御機構の解明と、培養時間の短縮などタンパク質生産条件の改善を目的として、SCMP プロモーターによる酵素発現の解析を行った。

［方法と結果］

実際の培養に用いられる宿主 *Streptomyces lividans* 1326 株における SCMP プロモーター下流の発現を、レポーター遺伝子としてロイシンアミノペプチダーゼ（LAP）を用いて検討したところ、TH-2 株での発現と同様に PG 培地でのみ、培養上清において LAP 活性が認められた。次に、SCMP プロモーターの 5’領域の 154 bp、362 bp、382 bp を欠失した発現ベクターを作成し、各欠失プロモーター下流 LAP の発現を検討した。その結果、すべての欠失プロモーターによって培養上清に LAP 活性が認められた。それらの LAP 活性は、全長 SCMP プロモーターによるものよりも高く、362 bp の欠失プロモーターによる LAP 活性が最も高かった。362 bp 欠失プロモーターを用いた培養上清の LAP 活性は、培養 2 日目から検出でき、SCMP プロモーター培養上清よりも高い LAP 活性を示すことが明らかになった。さらに、TSB 培地、0.1%リン酸培地、またグルコース以外の糖を含む培地においても、この欠失プロモーター下流の LAP 活性および LAP タンパク質発現が確認できた。以上の結果から、SCMP プロモーターの 5’ 領域は、リン酸およびグルコース関連因子によって負に制御されていることが示唆され、制御領域の欠失によって SCMP プロモーターによるタンパク質生産性が向上したと考えられた。

Streptomyces, promoter, protein expression

講演番号：4C25a04
講演日時：3 月 20 日 10:05～ C 校舎 25 会場

タイ産耐熱性メタノール資化酵母 *Ogataea thermomethanolica* BCC16875 のプロテアーゼ遺伝子破壊による組換えタンパク質生産性向上

Improvement of protein secretion using multiple protease gene disruption in thermotolerant yeast *Ogataea thermomethanolica* BCC16875

○西田 真実[1]、大橋 貴生[1]、金 達英[1]、Niran ROONGSAWANG[2]、Sutipa TANAPONGPIPAT[2]、藤山 和仁[1] ([1]阪大生国セ、[2]タイ王国国立遺伝子生命工学研究センター)

○ Mami NISHIDA[1], Takao OHASHI[1], Daryong KIM[1], Niran ROONGSAWANG[2], Sutipa TANAPONGPIPAT[2], Kazuhito FUJIYAMA[1] ([1]ICBiotech, Osaka Univ., [2]BIOTEC)

【目的】我々はタイ王国で単離、新規同定された耐熱性メタノール資化酵母 *Ogataea thermomethanolica* を用いて、異種タンパク質分泌生産システムの構築を行っている。本酵母においても、他の酵母の場合と同様に、分泌生産させた異種タンパク質が培地中で分解される現象が観察された。そこで、本酵母のプロテアーゼ遺伝子を単離・同定し、それらの破壊株を作製し、異種タンパク質が分泌後に受ける分解を低減することで物質生産により適した株を育種することを目的とした。

【方法】3 つの *O. thermomethanolica* 推定プロテアーゼ遺伝子（*OtPEP4*、*OtPRB1*、*OtYPS1*）をクローニングした後、*OtURA3* 遺伝子を選択マーカーとして用いてプロテアーゼ遺伝子座に挿入し、各遺伝子破壊株を構築した。*Aspergillus niger* 由来エンド-1,4-β-キシラナーゼ（AnXylB）をモデル組換えタンパク質として、各破壊株で分泌発現させ、培養上清を回収した。分泌発現させた AnXylB の SDS-PAGE および CBB 染色を行い、それぞれの破壊株における AnXylB 分泌発現量を評価した。さらに Somogyi-Nelson 法を用いて、AnXylB のキシラン分解活性を定量的に分析した。また、*OtPEP4* 遺伝子と *OtYPS1* 遺伝子の二重破壊株（*pep4*Δ*yps1*Δ）を作製した。

【結果】すべての遺伝子破壊株において、CBB 染色で見かけの AnXylB 発現量は野生株よりも上昇した。また活性測定より、AnXylB 分泌は野生株を 1 とした時、*pep4*Δ、*prb1*Δ、および *yps1*Δ株で約 3 倍増加した。よって、これらのプロテアーゼ遺伝子の破壊は物質生産に有効であることが示された。今後は、多重破壊株の分泌生産における影響について調べる予定である。

*Ogataea thermomethanolica*, protease, recombinant protein expression

発表責任者：藤山和仁（fujiyama@icb.osaka-u.ac.jp）

講演番号：4C25a05
講演日時：3 月 20 日 10:20～ C 校舎 25 会場

新奇耐熱性ペルオキシダーゼの探索
Discovery of novel thermostable peroxidase
○今井 岳志[1]、川本 純[2]、三原 久明[3] ([1]兵庫県立工業技術センター、[2]京大化研、[3]立命館大生命科学)
○TAKESHI IMAI[1], JUN KAWAMOTO[2], HISAAKI MIHARA[3] ([1]Hyogo Prefectural Institute of Technology, [2]Kyoto Univ., [3]Ritsumeikan Univ.)

【背景】リグニンは高等植物・シダ類などの細胞壁や導管組織にみられる木質組織で、地球上に最も多量に存在する芳香族ポリマーである．リグニンは遊離基の作用による縮合反応によって生成し、加水分解されやすい結合を持たないため非常に安定であるが、自然界では白色腐朽菌により分解されることが知られている．ポリマー分解やラジカル反応の制御に関わる分野の発展につながることが期待されることから、特に白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* において最も精力的に研究がなされてきた．一方で、過去行われた各種土壌を用いたポプラ材分解の実験などから、細菌によるリグニン分解力は弱く、関与は限定的というのが通説となっている．
【目的】一部のペルオキシダーゼおよびラッカーゼはリグニンを分解できることが知られており、担子菌類の仲間である白色腐朽菌がそれらを有する代表的な微生物である．一方で、極めて豊かな遺伝的多様性を有する細菌において関連する酵素の研究・報告数は限られており、リグニン分解活性を有することが確かめられている細菌は 2015 年においてわずか 10 種類となっている．そのため、リグニン関連酵素および細菌の諸性質や進化生物学的考察は未だ明確にはなっていない．また、応用分野においても工業利用に望ましい特性（耐熱、耐酸・塩基、耐有機溶媒、高発現・高活性など）を有したリグニン関連酵素は未だ見つかっていない．そこで、申請者は土壌細菌からリグニンを分解可能な新奇のペルオキシダーゼを探索した．
【方法・結果】リグニン（クラフトリグニン）を炭素源とした集積培養により土壌中からリグニンを資化可能な細菌をスクリーニングした．その結果、リグニンを炭素源として生育可能な細菌を数種得ることができた．その中で、リグニンの存在によって固体培地上でのスウォーミングを停止させるなど、明確にリグニンに応答する菌体を単離・同定した．さらに、大量培養後に菌体を溶解させることで作製した酵素溶液の諸性質を調べる中で、当該酵素が 100℃、1 時間のインキュベーション後においても ABTS に対して 90%以上の残存活性を示すなど、高い耐熱性を有するペルオキシダーゼであることを見出した．

peroxidase, lignin, thermostable

発表責任者：今井岳志（imai@hyogo-kg.jp）

講演番号：4C25a06
講演日時：3 月 20 日 10:35～ C 校舎 25 会場

# 糸状菌 *Aspergillus aculeatus* 由来糖化アミノ酸オキシダーゼの基質特異性

Substrate specificity of fructosyl amino acid oxidase from *Aspergillus aculeatus*

○合川 菜々子、谷 修治、炭谷 順一、川口 剛司 (阪府大院生環)
○Nanako AIKAWA, Shuji TANI, Jun-ichi SUMITANI, Takashi KAWAGUCHI (Osaka Pref. Univ.)

【背景】糖化アミノ酸オキシダーゼ(FAOD)は糖化アミノ酸を酸化的に加水分解し、アミノ酸、グルコソン、過酸化水素を生成する反応を触媒するため、プロテアーゼと併用することで糖化ヘモグロビン($HbA_{1c}$)の定量に利用できる。糖化アミノ酸には糖がN末端アミノ酸のα-アミノ基に結合したものと、Lys 側鎖のε-アミノ基に結合したものが存在し、FAOD はα-糖化アミノ酸のみを認識するα型、ε-アミノ酸のみを認識するε型、両方を認識するα・ε型の 3 種類に分類される。$HbA_{1c}$ はβ鎖 N 末端のバリン残基が糖化されているため、糖化バリン特異的に測定することができれば、$HbA_{1c}$ 特異的に定量することが可能である。*Fusarium oxysporum* 由来 FAOD はα-糖化アミノ酸、ε-糖化アミノ酸の両方を認識するα・ε型であるが、K373 を別のアミノ酸に置換するとα-糖化アミノ酸に対する活性を失い、ε型となる[1)]。この Lys 残基は、他微生物由来の FAOD や糖化ペプチドオキシダーゼ(FPOD)のα-糖化アミノ酸を認識するα型およびα・ε型では保存されていたが、α-糖化アミノ酸を認識できないε型ではMetに置換されていた。当研究室においてゲノム情報が明らかとなった糸状菌 *Aspergillus aculeatus* は FAOD ホモログ遺伝子を 5 つ持つことが判明した。そこで、本研究では FAOD ホモログ遺伝子 5 つを大腸菌で発現させ、発現産物の諸性質について明らかにするとともに *F. oxysporum* FAOD における K373 に相当するアミノ酸の基質特異性に与える影響について検討することを目的とした。

【方法・結果】ホモログ遺伝子 *fao1～5* について、発現プラスミドや発現条件を検討することで、全て可溶性タンパクとして発現させることに成功した。発現産物の基質特異性について調べたところ、FAO3 と FAO5 において FAOD 活性が検出され、FAO3 は $N^{\varepsilon}$-fructosyl $N^{\alpha}$-Z-lysine(FZL), FAO5 は FZL, fructosyl valine(FV) に反応し、それぞれε型、α・ε型の基質特異性が見られた。また、*F. oxysporum* の K373 に相当するアミノ酸は FAO3 では M375、FAO5 では K366 となっており、*F. oxysporum* で予測された結果と合致した。そこで、FAO3 および FAO5 について詳細に検討するために発現量の改善を期待して、これらの遺伝子の開始コドンから約 500 bp を大腸菌の codon usage に合わせた配列に置換した発現系を構築し、大腸菌でのタンパク発現量を向上させた。この系を用いて Lys と Met を入れ替えた変異体 FAO3 M375K と FAO5 K366M の取得を試みた。FAO5 K366M の取得に成功し、FZL に対する活性のみ確認でき、α・ε型からε型へ基質特異性を変換することに成功した。今後 FAO3 M375K の取得と、FAO3・FAO5 および変異体についてカイネティックパラメーターを測定する予定である。

1) Fujiwara *et al. Appl Microbiol Biotechnol,* 74, 813-819, 2007

fructosyl amino acid oxidase, *Aspergillus aculeatus*, substrate specificity

講演番号：4C25a07
講演日時：3 月 20 日 11:00～ C 校舎 25 会場

*Streptomyces corchorusii* 由来蛋白性アミラーゼ阻害剤 Paim の阻害特異性に関与する領域の同定
Identification of the region responsible for inhibitory specificity in a proteinaceous α-amylase inhibitor, Paim from *Streptomyces corchorusii* by comprehensive saturation mutagenesis
○渡邉 卓弥、谷 修治、炭谷 順一、川口 剛司（阪府大院生環）
○ Takuya WATANABE, Shuji TANI, Jun-ichi SUMITANI, Takashi KAWAGUCHI (Osaka Pref.Univ.)

【背景と目的】放線菌由来蛋白性アミラーゼ阻害剤は 70～80 アミノ酸程度で構成される単純蛋白質で, 動物・放線菌アミラーゼを特異的に阻害する。いくつかの阻害剤では X 線結晶解析や NMR によって立体構造が明らかにされており, それ以外の阻害剤についても Cys 残基の位置が完全に保存されていることから，各種阻害剤は似通った立体構造であると考えられている。しかし，その阻害活性は阻害剤とアミラーゼの組み合わせによって大きく異なり，各々の蛋白性阻害剤が固有の阻害スペクトルを有している。これら阻害剤の阻害活性に重要な働きを担うアミノ酸は N 末端側に高度に保存されている Trp-Arg-Tyr モチーフであることが既に同定されている。しかし，多様な阻害スペクトルを示す阻害特異性については保存性の低い部分の関与が大きいと示唆されているものの，阻害特異性に関与する詳細な領域は不明である。*Streptomyces corchorusii* が生産する蛋白性アミラーゼ阻害剤 Paim は，ブタ膵臓型アミラーゼに対しては阻害活性を示すが，これまで単離された阻害剤の中でヒトアミラーゼに対しては阻害活性を示さない唯一の阻害剤である。以前のランダム変異導入実験で Paim の Glu55, Leu58，Glu60 部位の特定のアミノ酸置換によって，ヒトアミラーゼアイソザイムの両方に対する阻害能を獲得する変異阻害剤が得られている。本研究では，網羅的な変異導入によってヒトアミラーゼに対する阻害能をもつ Paim 変異体を獲得することで，阻害特異性に関与するアミノ酸を同定し，更なる知見を得ることを目的とした。
【方法と結果】Paim のアミノ酸配列に対して最も identity が高い Tendamistat と異なるアミノ酸配列に着目し，以前までの研究でヒトアミラーゼに対する阻害特異性に関わると同定されたアミノ酸を除いた 42 箇所のアミノ酸を選抜し，各々saturation mutagenesis を行うことで目的に適う変異阻害剤の単離を試みた。その結果, ヒト唾液型アミラーゼに対して阻害能を示した 7 種類の変異 Paim (M11R, T19M，T27G，Q35G，G40T，L45V，H61L) が得られた。現在，得られた変異阻害剤の精製を進めているところであり，ヒト膵臓型アミラーゼを含む各種動物アミラーゼに対する阻害特異性や詳細な性質について検討する予定である。

α-amylase inhibitor, *Streptomyces*, saturation mutagenesis

講演番号：4C25a08
講演日時：3 月 20 日 11:15～ C 校舎 25 会場

# HAD スーパーファミリーに属するハロ酸デハロゲナーゼのフルオロ酢酸分解活性の比較

# Comparison of dehalogenase activity toward fluoroacetate between dehalogenases in haloacid dehalogenase superfamily

○李 貢順[1]、山田 柊人[2]、中村 卓[3] ([1]長浜バイオ大学バイオサイエンス研究科、[2]長浜バイオ大学バイオサイエンス学部、[3]長浜バイオ大学)
○Gongshun Li[1], Shuto Yamada[2], Takashi Nakamura[3] ([1]Master of Nagahama Inst, [2]Bachelor of Nagahama Inst, [3]Professor of Nagahama Inst)

［目的］

我々はハロ酸デハロゲナーゼスーパーファミリー（HAD superfamily）に属し、環境に有害な有機ハロゲン化合物を分解できる *Pseudomonas* sp. YL 由来の L-2-ハロ酸脱ハロゲン化酵素（L-DEX YL）を研究している。L-DEX YL は基質であるハロ酸の C-Cl 結合または C-Br 結合を切断できるものの、C-F 結合を切断できないと過去の論文で報告された。しかし、近年我々は、L-DEX YL のフルオロ酢酸（MFA）に対する分解活性を確認した。更に、同じファミリーに属する新規の 4 種類の酵素 Adeh3811、Bpro0530（Bpro）、Bpro4516 そして RHA1_ro0023 にも脱フッ素化活性があることが別のグループにより報告され、RHA の MFA に対する比活性が 0.68 μmol/min/mg protein（U/mg）となり、一番脱フッ素化活性が高かった。そこで、我々の研究室で現在精製できた L-DEX YL と Bpro の MFA 分解活性に関しての至適 pH、至適温度、そして熱安定性までのデータを出して比較し、その違いから L-DEX YL の脱フッ素化活性向上のためのヒントを得ることを本研究の目標とした。

[方法]

HAD superfamily に属する L-DEX YL と *Polaromonas* sp. 由来の Bpro を *E. coli* JM109 で発現させ、N 末端に His-tag を付加した目的の酵素の発現系を構築した。前培養と本培養、アフィニティクロマトグラフィーで目的酵素を精製して回収した。Bradford 法で得られた酵素の濃度を決定し、そして MFA を基質として、濃硫酸とクロモトピック酸を用いたグリコール酸定量法により L-DEX YL と Bpro0530 の活性測定を行った。

[結果]

Bradford 法よりタンパク濃度を算出したところ、LB 培地 100 ml あたり L-DEX YL と Bpro をそれぞれ 20.27 mg と 1.54 mg 精製できた。続いて、30℃ で反応させ、pH を振りながらグリコール酸定量による活性測定を行ったところ、HEPES buffer pH 7.0 の条件で、Bpro の MFA に対する比活性が 0.32 U/mg となり、最も高い脱フッ素化活性を示した。現在は、（30℃-70℃）の範囲で活性測定を行い、Bpro の至適温度を調査している。本学会では、Bpro と L-DEX YL の結果を比較して活性の違いについて考察した内容を発表する予定である。

haloacid dehalogenase superfamily enzymes, activity toward fluoroacetate, characterization

講演番号：4C25a09
講演日時：3 月 20 日 11:30～ C 校舎 25 会場

フルオロ酢酸分解活性の向上したハロ酸デハロゲナーゼ L-DEX YL 変異体の量子化学計算によるデザインと 実験による検証 (2)

Design of haloacid dehalogenase L-DEX YL mutants that improve the defluorination activity toward fluoroacetate by Quantum-Mechanical calculation and its verification by activity measurement(2)

○福田 昌寛[1]、岩崎 静斗[1]、棚田 悠介[1]、中村 卓[1]、田中 成典[2] ([1]長浜バイオ大、[2]神大院)
○ Masahiro Fukuda[1], Shizuto Iwasaki[1], Yusuke Tanada[1], Takashi Nakamura[1], Shigenori Tanaka[2] ([1]Nagahama Inst., [2]Kobe Univ.)

[背景] フッ素化合物は自然界において残留性が高く環境汚染物質として存在するものもある。我々は環境に有害な有機ハロゲン化合物の一種であるハロ酸の分解を触媒する代表的な酵素 *Pseudomonas* sp. YL 由来の L-2-ハロ酸デハロゲナーゼ（L-DEX YL）を研究している。これまでのところ、L-DEX YL は塩素や臭素のついたハロ酸は分解できるがフルオロ酢酸（MFA）などフッ素のついたハロ酸はほぼ分解できないとされている。

先行研究から、L-DEX YL は基質の L-2-ハロアルカン酸を二段階反応によって分解することが知られている。一段階目では、触媒残基である Asp10 のカルボキシル基の酸素原子が L-2-ハロ酸の C2 炭素に対して求核攻撃を行い、エステル中間体を形成する。二段階目ではエステル中間体の周辺に存在する水分子が Asp10 の $C_\gamma$ 原子を攻撃し、加水分解によって Asp10 の再生と立体反転した D-2-ヒドロキシ酸が生成する。本研究では、L-DEX YL－MFA 複合体構造において、MFA と MFA 周辺の反応に関わる残基については量子化学(QM)計算を行い、それ以外の部分は分子力学(MM)計算を行う QM/MM 法により MFA の脱フッ素化反応の活性化エネルギーを計算した。そして得られた結果を基に、MFA を効率よく分解できる L-DEX YL 変異体デザインを行った。今までの研究で、Y12W（シングルミュータント）Y12W_F60Y（ダブルミュータント） 変異体の計 2 つを作製したが、野生型よりも効率よく MFA を分解できるものはできなかった。今回デザインした変異体では計算上野生型よりも活性化エネルギーが低くなる変異体をデザインすることができたため、この変異体のデザインの妥当性を実験により検証した。

[方法] 量子化学計算ソフト(Gaussian 09) と Gaussian 計算結果可視化ツール(Gauss View 5.0.9)を用いて L-DEX YL－MFA 複合体構造の入力ファイルを作製した。QM/MM 法を用いて L-DEX YL－MFA 複合体の脱フッ素化反応をコンピュータ上で再現し一段階目の反応の活性化エネルギーを算出した。また、反応前構造と遷移状態構造において、QM 法を適用した領域のアミノ酸一つずつに対してエネルギー一点計算を行いその差を算出することでそのアミノ酸ごとの活性化エネルギーへの寄与を測定した（Decomposition Analysis)。Decomposition Analysis で得られた結果を基に、L45K(シングルミュータント), Y12S_L45K_N119T、L45K_S118A_N119T (トリプルミュータント) の変異体をデザインした。

[結果と今後の予定] 野生型の L-DEX YL が MFA を分解するための一段階目の反応の活性化エネルギーは 45.3kcal/mol と算出され、L45K,、Y12S_L45K_N119T、L45K_S118A_N119T ではそれぞれ 39.5 ,37.7 ,35.8 kcal/mol と野生型よりも低い結果が出た。そのため実験により上記の変異体を作製して、MFA 分解活性を測定する実験に現在取り組んでおり、その結果については本大会で発表する予定である。

Quantum chemistry calculation, Halo acid dehalogenase, Fluoroacetic acid

発表責任者：福田 昌寛（b112133@m.nagahama-i-bio.ac.jp）

講演番号：4C25a10
講演日時：3 月 20 日 11:45～ C 校舎 25 会場

*Caenibacillus caldisaponilyticus* B157$^T$ 株が産生する新規ホスホリパーゼ A の成熟化における C 末端プロペプチドと性質決定

Characterization of a novel phospholipase A and functional analysis of C-terminal propeptide for the maturation in *Caenibacillus caldisaponilyticus* B157$^T$

○齋藤 遼[1]、古谷 洋人[1]、辻本 善之[1]、鶴岡 直樹[2]、茂里 康[2]、渡部 邦彦[1]([1]京府大院生命環境、[2]産総研)

○ Ryo SAITO[1], Hiroto FURUYA[1], Yoshiyuki TSUJIMOTO[1], Naoki TSURUOKA[2], Yasushi SHIGERI[2], Kunihiko WATANABE[1] ([1]Kyoto Pref. Univ., [2]AIST)

【背景・目的】 *Caenibacillus caldisaponilyticus* B157$^T$ 株は生ごみを酸性・高温条件下で堆肥化したアシドロコンポストより単離され、ホスファチジルコリン (PC) 等のリン脂質を加水分解するホスホリパーゼ A (PLA)を細胞外に分泌する[*]。先行研究で、B157$^T$ 株のゲノム情報に基づき本酵素の遺伝子を同定・クローン化し、組換え ProplaA (rProplaA)として大腸菌で発現させたが、酵素活性は低かった。そこで rProplaA と B157$^T$ 株培養上清を反応させると rProplaA が開裂し、高活性を有する成熟型 rPlaA と C 末端プロペプチド (rC-pro)が生成したため、rProplaA はプロセシングを受け、活性化することが示唆された。次に成熟型 rPlaA のみの発現を行ったが、活性はほとんど検出されず、正しい立体構造を形成していないことが示唆されたため、成熟化における rC-pro の影響が示唆された。そのため本研究では rProplaA と B157$^T$ 株培養上清画分 (プロテアーゼ)を用いて rC-pro の機能と成熟型 rPlaA の性質を決定することとした。

【方法・結果】 ProplaA をコードする遺伝子を pET11a に組み込み、*Escherichia coli* Rosetta (DE3)で発現を行った結果、37°C での IPTG 誘導において可溶性画分に発現した。その無細胞抽出液に対し 60% 硫安沈殿、熱処理 (60°C)、DEAE-Cellulose 陰イオン交換カラムを用いて電気泳動的に均一に精製した。得られた精製標品 (rProplaA)を B157$^T$ 株培養上清でプロセシング反応 (pH 5.0, 60°C)を行い、反応混合液 (rProplaA+上清)を用いて PLA 活性を測定した。卵黄 PC を基質として PLA 反応を行い、TLC で活性を評価した結果、プロセシング前後で少しの活性増加しか認められなかったが、染色ゲル (卵黄レシチン、フェノールレッド)を用いた活性染色では、プロセシング後において顕著な活性バンド得られた。そこで反応混合液を用いて電気泳動を行うと、プロセシング後サンプルを用いた SDS-PAGE では、rProplaA、成熟型 rPlaA、rC-pro とバンドが分離するが、Native-PAGE や Blue native-PAGE では、バンドの分離は認められなかった。また活性染色において、SDS-PAGE 後では活性バンドは検出できるが、Native-PAGE 後では検出できなかった。これらの結果から rC-pro 断片はプロセシング後も活性部位に結合し、活性を阻害することが示唆された。そこでプロセシング反応後のサンプルを 2% SDS で前処理すると有意に活性が増加したため、rC-pro による活性阻害の可能性を強く示唆することができた。現在、成熟型 rPlaA を用いて性質決定を行っている。

[*] *Int J Syst Evol Microbiol.,*66, 2684-2690 (2016)

phospholipase A, processing, C-terminal propeptide

講演番号：4C26a01
講演日時：3 月 20 日 09:20～ C 校舎 26 会場

マイトファジー抑制による出芽酵母の細胞質物質生産能力向上
Mitophagy repression for cytosolic bio-production in *Saccharomyces cerevisiae*
○森田 啓介[1]、松田 史生[1]、岡本 浩二[2]、石井 純[3]、近藤 昭彦[3]、清水 浩[1] ([1]阪大院・情報、[2]阪大院・生命、[3]神戸大院・イノベ)
○Keisuke MORITA[1], Fumio MATSUDA[1], Koji OKAMOTO[2], Jun ISHII[3], Akihiko KONDO[3], Hiroshi SHIMIZU[1] ([1]Grad. Sch. IST, Osaka Univ., [2]Grad. Sch. FBS, Osaka Univ., [3]Grad. Sch. STI, Kobe Univ.)

【目的】出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のマイトファジー必須因子をコードする *ATG32* 破壊株では、エタノール発酵能力が野生株と比べて向上するなどの代謝変動が示唆されている (Okamoto *et.al.*, 2009、Shiroma *et.al.*, 2014)。本研究では *S. cerevisiae* 野生株と *ATG32* 破壊株のメタボローム分析を実施し、マイトファジーの抑制が *S. cerevisiae* 物質生産能に与える影響を評価した。また、これらの株に炭素数 4 の高級アルコールである 2,3-ブタンジオール生産能を付与した株を作出し、マイトファジーの抑制が引き起こす代謝変動を利用した *S. cerevisiae* 物質生産能力の向上を試みた。
【方法】*S. cerevisiae* BY4742 株 (*MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0*) および *ATG32* 破壊株に酢酸リチウム法を用いてベクターを導入し、形質転換体を構築した。発酵性試験では要求性を満たすようにアミノ酸を添加した 20 g/L のグルコースを炭素源とする 5 mL の SD 培地を用い、初期 $OD_{660}$ を 1 として 30℃、150rpm で微好気培養した。培養開始から 24 時間目の菌体をフィルター法で回収し、メタノール-クロロホルム-水法で抽出した代謝物中間体を LC-MS/MS で分析した。また、培養開始から 48 時間目の培溶液中に含まれるアルコール濃度をガスクロマトグラフィーで測定した。
【結果】*S. cerevisiae* BY4742 株および *ATG32* 破壊株の解糖系代謝物を相対定量した結果、*ATG32* 破壊株では野生株と比べてピルビン酸濃度が 1.9 倍に上昇し、一方でアセチル CoA 濃度が 2/5 倍に減少していた。また *ATG32* 破壊株は発酵開始 48 時間後に 6.81±0.13 g/L のエタノールを生産し、野生株(6.39±0.05 g/L) に比べて 6%程度高いエタノール発酵能を示した。このことから、*ATG32* 破壊株ではマイトファジーの抑制によってミトコンドリア内の代謝活性が弱まり、余剰となったピルビン酸が細胞質中でエタノールに変換されていると考えられる。この余剰ピルビン酸をエタノール以外の物質生産に転用できないかと考え、BY4742 株に *Lactobacillus plantarum* 由来の *als* と *Lactococcus lactis* 由来の *aldc* を酵母にコドン最適化した *AlsLpOp* と *AldcLlOp*、出芽酵母の *BDH1* を過剰発現した 2,3-ブタンジオール生産株 (SCM043 株) を構築した。発酵性試験の結果、SCM043 株の培養開始 48 時間後の 2,3-ブタンジオール濃度は 23.5±12.8 mg/L だった。この株に対し、*ATG32* 破壊株に同様の遺伝子を過剰発現した SCM042 株では 557.0±20.6 mg/L の 2,3-ブタンジオール生産濃度を達成し、SCM043 株の 23.7 倍に向上した。また、メタボローム分析の結果、SCM042 株と SCM043 株の細胞内ピルビン酸濃度の有意差は無くなっていた。

*Saccharomyces cerevisiae*, mitophagy, 2,3-butanediol

発表責任者：森田啓介（k-morita@ist.osaka-u.ac.jp）

講演番号：4C26a02
講演日時：3 月 20 日 09:35～ C 校舎 26 会場

# 核酸医薬原料 2'-*O*-メチルリボヌクレオシド生産に向けた微生物由来ヌクレオシドハイドロラーゼの触媒機能解析

# Characterization and application of microbial nucleoside hydrolases for the enzymatic synthesis of 2'-*O*-methylribonucleosides as promising intermediates of nucleic acid drug

○光川 侑輝[1]、日比 慎[2]、松谷 成裕[1]、堀之内 伸行[1]、高橋 里美[2]、小川 順[1] ([1]京大院・農・応用生命、[2]京大院・農・産業微生物)
○Yuuki MITSUKAWA[1], Makoto Hibi[2], Narihiro Matsutani[1], Nobuyuki Horinouchi[1], Satomi Takahashi[2], Jun Ogawa[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Ind. Microbiol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【背景と目的】

Fomivirsen に代表される核酸医薬は高い標的特異性と低い抗原性を持つ一方、生体内で容易に分解されるという欠点を持つ。2'-*O*-メチルリボヌクレオシド (2'-OMe-NRs)の導入によってオリゴヌクレオチド鎖の熱安定性およびヌクレアーゼ耐性が向上することが報告されているが、2'-*O*-メチルアデノシン (2'-OMe-AR) をはじめとする 2'-*O*-メチルプリンヌクレオシドは化学合成が困難であり、実用における大きな障害となっている。そこで、微生物酵素による効率的な 2'-*O*-メチルプリンヌクレオシド合成を目指し、2'-OMe-NRs に活性を持つ微生物を探索した。その結果、2'-*O*-メチルウリジン (2'-OMe-UR) 代謝能を持つ乳酸菌一株および放線菌一株が得られ、それぞれより新規なヌクレオシドハイドロラーゼである *Lb*NH および *Ag*NH を単離、同定した。両酵素は 2'-OMe-NR に対する加水分解活性に加えて、2'-OMe-UR とアデニンの存在下で 2'-OMe-AR を合成する糖転移活性も示した。本研究では、これらの酵素が持つ諸特性の解析に取り組むとともに、2'-OMe-NRs の酵素合成への応用について検討を行った。

【結果】

*Lb*NH および *Ag*NH が触媒する加水分解反応について基質特異性を解析したところ、両酵素は共に 2'-OMe-NRs およびグアノシン類縁体に対して強い加水分解活性を示した。糖転移反応における糖受容体の基質特異性においては、*Lb*NH がアデニンを基質とした際に顕著な糖転移活性を示した一方、*Ag*NH はアデニンのほか、2-アミノ-6-クロロプリンやシトシンに対しても高い糖転移活性を示した。また、速度論的解析から両酵素が触媒する加水分解反応がアデニンによる混合型非競合阻害を受けることが明らかとなり、以上の結果に基づいて *Lb*NH と *Ag*NH が触媒する反応機構モデルを作成した。

これらの微生物酵素による 2'-OMe-AR の酵素合成では、基質および生成物の加水分解による収率の低下が課題となった。そこで各種反応条件を検討したところ、グリセロールおよび多糖の添加によって加水分解活性を選択的に抑制できることを明らかにした。*Lb*NH を用いた至適条件下での反応では収率が 3 倍近く向上し、最終的に 0.16g/L(0.58 mM)の 2'-OMe-AR 生産を達成した。また、*Ag*NH を用いた反応では、2'-OMe-UR と 2-アミノ-6-クロロプリンを基質とする糖転移反応において生成物の経時的な蓄積が観察された。

nucleic acid drug, nucleoside hydrolase, transribosylation

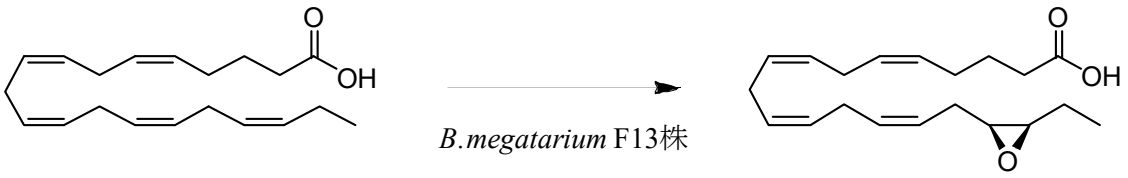
講演番号：4C26a03
講演日時：3 月 20 日 09:50～ C 校舎 26 会場

*Bacillus megaterium* F13 株による EPA 酸化代謝物（17,18-EpETE）の生産条件の検討
Evaluation of 17,18-EpETE production conditions using *Bacillus megaterium* F13

齊藤 一輝[1]、○大地 健介[1]、竹内 道樹[1,2]、永野 秀昭[2]、岸野 重信[1]、小川 順[1]（[1]京大院農・応用生命、[2]京大院農・産業微生物）
Kazuki SAITO[1], ○Kensuke OCHI[1], Michiki TAKEUCHI[1,2], Hideaki NAGANO[2], Shigenobu KISHINO[1], Jun OGAWA[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Lab. Ind. Microbiol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【目的】エイコサペンタエン酸（*cis*-5,*cis*-8,*cis*-11,*cis*-14,*cis*-17-eicosapentaenoic acid; EPA）は、閉塞性動脈硬化症や高脂血症の治療薬として用いられている。また、近年 EPA にエポキシ基や水酸基が導入された酸化代謝産物に、抗炎症作用や抗アレルギー作用など様々な生理活性が報告されている[1) 2)]。我々はこれまでに EPA 酸化代謝物を生産する微生物の探索を行い、*Bacillus megaterium* F13 株が EPA 酸化代謝物である 17,18-EpETE を生産することを見出した。本研究では、*B.megaterium* F13 株を用いて 17,18-EpETE を生産する際の培養条件・反応条件の最適化を行った。
【方法・結果】*B.megaterium* F13 株を 28℃、300 rpm の好気条件で 16 時間培養後、集菌・洗浄し得られた洗浄菌体を用いて、好気条件下で EPA（終濃度 1.7 mM）の変換反応を行った。反応液から基質および生成物をクロロホルム・メタノールで抽出し、遠心エバポレーターで濃縮した後、高速液体クロマトグラフ質量分析計（LCMS）分析に供した。以上の条件の下、反応時の温度、時間、pH について反応条件の最適化を行った。さらに、培養時の炭素源及び窒素源の検討を行い 17,18-EpETE の最適生産条件を決定した。

1) Endo, J. et al. (2014). *J. Exp. Med.*, 211(8), 1673-1687.
2) Kunisawa, J. et al. (2015). *Sci. Rep.*, 5




EPA　　17,18-EpETE

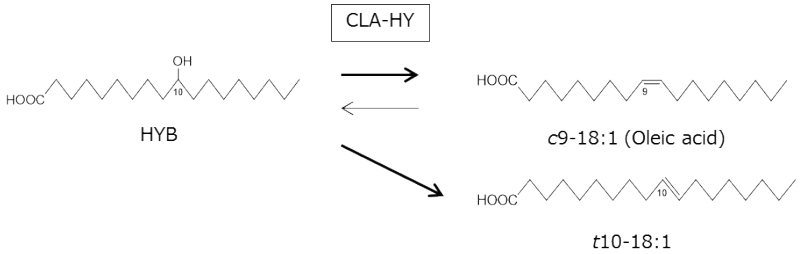
eicosapentaenoic acid, bacillus, 17,18-EpETE

発表責任者：岸野重信（kishino@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4C26a04
講演日時：3 月 20 日 10:05～ C 校舎 26 会場

10-hydroxy-octadecanoic acid の酵素的脱水反応における *cis*/*trans* 異性体制御
*cis*/*trans* isomerism control in enzymatic dehydration of 10-hydroxy-octadecanoic acid
岸野 重信、○雑賀 あずさ、谷 実歩、小川 順（京大院農・応用生命）
Shigenobu Kishino, ○Azusa Saika, Miho Tani, Jun Ogawa (Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【目的】トランス脂肪酸は不飽和脂肪酸の一種であり、油脂を加工、精製する工程で生産されることからマーガリン、ショートニングなどに含まれているほか、天然では反芻動物の胃内の嫌気性細菌により生産され、牛肉や乳製品に含まれている。トランス脂肪酸の過剰摂取により、血中悪玉コレステロールの増加および善玉コレステロールの減少が引き起こされ、その結果、冠動脈性心疾患の発症リスクが高まることが近年明らかになってきている。そのため、食品生産において *cis*/*trans* 異性体制御技術の開発が求められている。当研究室では、乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* AKU 1009a におけるリノール酸飽和化代謝経路を明らかにしており、この代謝経路では、水和脱水酵素 CLA-HY が触媒する脱水反応により、10-hydroxy-octadecanoic acid (HYB) から *cis*-9-octadecenoid acid (Oleic acid) とトランス脂肪酸である *trans*-10-octadecenoic acid (*t*10-18:1) が生成する [1)2)]。そこで、*L. plantarum* AKU 1009a による脱水反応をモデル反応として用い、HYB から Oleic acid, *t*10-18:1 を生成する際の *cis*/*trans* 異性体制御について検討を行った。




【結果・方法】精製 CLA-HY を用いた HYB の脱水反応において、様々な反応条件を検討した結果、レシチンの添加により、*t*10-18:1 への変換が抑制されることを見出した。さらに、*L. plantarum* AKU 1009a の洗浄菌体を用い HYB を基質とした休止菌体反応を行った場合においても、レシチン添加により同様の結果が得られた。このことから、*L. plantarum* AKU 1009a によるトランス脂肪酸生成の抑制にレシチンが有効であることが示された。

【参考】
1) Kishino, S., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110(44), 17808–17813 (2013)
2) Takeuchi, M., et al., *J. Mol. Catal., B Enzym.* 117, 7-12 (2015)

*cis*/*trans* isomerism control, lipid metabolism, dehydration

発表責任者：岸野　重信（kishino@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4C26a05
講演日時：3 月 20 日 10:20～ C 校舎 26 会場

*Chryseobacterium* sp. 5-3B 由来 *N*-アセチルトランスフェラーゼの基質認識部位の探索
Analysis for domains for substrate recognition of *N*-acetyltransferase from *Chryseobacterium* sp. 5-3B

○竹中 慎治[1]、尾関 貴博[1]、田中 耕生[2]、石川 周[3]、吉田 健一[3] ([1]神戸大院農、[2]神戸大院自然、[3]神戸大院科学)
○ Shinji TAKENAKA[1], Takahiro OZEKI[1], Kosei TANAKA[2], Shu ISHIKAWA[3], Ken-Ichi YOSHIDA[3] ([1]Kobe Univ. Grad. Sch. Agri., [2]Kobe Univ. Grad. Sch. Sci., [3]Kobe Univ. Org. Adv. Sci. Technol.)

【目的】本研究では、微生物による芳香族アミンの代謝分解系を明らかにする過程で見出した反応機構を参考に、脂肪族アミンのアミノ基を立体選択的に *N*-アセチル化する酵素生産菌についてその酵素特性を明らかにすることを目的としている。*Chryseobacterium* sp. 5-3B 株の生産するアセチル CoA 依存性 *N*-アセチルトランスフェラーゼ（5-3B_NatA）は、キラルアミンである 2-フェニルグリシンの L-体（*S*-体）に対してのみ活性を示す特異な酵素であり、Growing cell によりラセミ体混合物の光学分割に応用可能である。[1,2] 本報告では、GCN5 *N*-アセチルトランスフェラーゼ（GNAT）ファミリーに属する既報の酵素類を基にモデリングにより構造比較し、部位特異的変異導入によりアセチル CoA や L-2-フェニルグリシンの認識に関わるアミノ酸残基の推定について述べる。

【方法】　酵素活性：アセチル CoA 共存下で反応を行い、2-フェニルグリシンの *N*-アセチル化物である 2-アセチルアミノ-2-フェニル酢酸の生成量（HPLC 法）または遊離 CoASH 量（DTNB 法）を定量し、算出した。酵素遺伝子発現：*natA* 断片を pET28b ベクターに組み込み、大腸菌 BL21 株に導入して得られた形質転換株で組み換え酵素を発現させた。[2]

【結果】　5-3B_NatA は既報のアリルアミン *N*-アセチルトランスフェラーゼやアリルアルキルアミン *N*-アセチルトランスフェラーゼとは類似性が低く、*N*-アセチルトランスフェラーゼと機能が推定されている類縁酵素との比較からもアセチル CoA の結合に関わると予想されている数個のアミノ酸残基しか見いだせなかった。そこで、立体構造が解析されている *N*-terminal アセチルトランスフェラーゼ類（PDB code: 5C88（*Sulfolobus solfataricus*）, 4KVO（*Schizosaccharomyces pombe*）, 2CNS（*Salmonella enterica*）等）を基に推定高次構造モデリングを行った。5-3B_NatA の配列中には、同トランスフェラーゼ類に保存されているアセチル CoA 結合モチーフ（R/Q-X-X-G-X-G/A）と類似した配列がみられ、Asn[25]～Met[35]、Met[87]～Val[89]、Gln[94]～Tyr[100]、Leu[120]～Lys[135] の領域に含まれるアミノ酸残基が基質結合またはアセチル CoA の結合に関わると推定できたことから、部位特異的変異導入により各アミノ酸残基を Ala 残基等に変えた変異酵素を調製した。酵素活性の変化を調べた結果、Asn[25]、Ile[29]、Thr[122]、Tyr[133] の変異酵素は明らかに活性の低下が見られた。現在、各変異酵素について反応速度論的な解析を行っている。(1) S. Takenaka et al., Biotechnol Lett. 35(7): 1053-9, 2013.　(2) S. Takenaka et al., Appl Environ Microbiol. 80(5): 1770-6, 2014.

Chryseobacterium, N-acetyltransferase, phenylglycine

発表責任者：竹中　慎治（stakenaka@people.kobe-u.ac.jp）

講演番号：4C26a06
講演日時：3 月 20 日 10:35～ C 校舎 26 会場

遺伝子組み換え麹菌培養上清カクテルを用いた希少糖高生産プロセスの開発
Bioconversion of rare sugar using enzyme cocktail prepared from genetically engineered *Aspergillus oryzae* cultures

○若井 暁[1]、浅井 菜々実[1]、荻野 千秋[2]、堤 浩子[3]、秦 洋二[3]、松沢 智彦[4]、矢追 克郎[4]、近藤 昭彦[1] ([1]神戸大院イノベ、[2]神戸大院工、[3]月桂冠総研、[4]産総研生物プロセス)
○Satoshi WAKAI[1], Nanami ASAI[1], Chiaki OGINO[2], Hiroko TSUTSUMI[3], Yoji HATA[3], Tomohiko MATSUZAWA[4], Katsuro YAOI[4], Akihiko KONDO[1] ([1]Grad. Schol. Sci. Tech. Innov., Kobe Univ., [2]Grad. Schol. Engin., Kobe Univ., [3]Gekkeikan Co., Ltd., [4]AIST)

機能性オリゴ糖は、整腸作用および血清脂質改善効果、過酸化脂質上昇抑制効果、免疫賦活活性などの種々の生体調節機能が見出されており、近年、生活習慣病等の予防効果があるとして期待されている。機能性オリゴ糖様の働きをすることが示唆されているイソプリメベロースは、キシロースがグルコースにα-1,6 結合した二糖であり、キシログルカンを原料として複数の酵素処理を経て、最終的にイソプリメベロース生産酵素（IPase）を用いて生産することが可能である。現在、IPase 以外にイソプリメベロースを生産する酵素は知られていない。黄麹菌 *Aspergillus oryzae* が IPase 活性を持つことは既に知られており、黄麹菌の持つ GH3 酵素の一つが IPase であることを Matsuzawa らが発見しているが、*Pichia pastoris* を用いた発現系での酵素生産性は 7 mg/L であった(J. Biol. Chem. 2016)。本研究では、この IPase をコードすると推定される遺伝子の高発現および発現酵素によるイソプリメベロース生産を目指した。

麹菌でのマルチコピー遺伝子導入法である Co-transformation により複数の形質転換体を取得し、培養上清の分泌生産性の高い物を一株選抜した。本株は 3%GPY 培地、30°C で 7 日間培養後、培養上清に約 0.5～0.7 g/L のタンパク質を分泌発現した。発現宿主を *P. pastoris* から *A. oryzae* に変更することで、酵素生産性は 70～100 倍上昇した。培養上清を用いてキシログルカンオリゴ糖の分解試験を行った結果、イソプリメベロースの生産が確認された。しかし、本培養上清だけでは、タマリンド種子キシログルカンからイソプリメベロースを生産することは出来なかった。

我々は、これまでに co-transformation 時のコピー数多形とプロモーター強度を加味することでセルラーゼ活性を 40 倍に高めたセルラーゼ高発現麹菌の構築に成功している。そこで、IPase 高発現株とセルラーゼ高発現株の培養上清を混合したカクテルを調製し、タマリンド種子キシログルカンからのイソプリメベロースの直接生産を検討した。その結果、培養上清カクテルを用いた 60°C、1 時間の反応で、5 g/L のキシログルカンから 1 g/L のイソプリメベロースの生産に成功した。

現在、イソプリメベロースは、約 16,000 円/50 mg（試薬グレード）で販売されており、本プロセスを用いると約 30 万円相当の希少糖を一時間で生産することが可能である。今後、IPase とセルラーゼの共・強発現株を作成し、より簡略された生産プロセスを構築すると共に、本希少糖の追加の機能性についても検討を進める予定である。

rare sugar, Aspergillus oryzae, cellulase

発表責任者：若井暁（wakaists@pegasus.kobe-u.ac.jp）

講演番号：4C26a07
講演日時：3 月 20 日 11:00～ C 校舎 26 会場

# コリネ型細菌を用いたフェルラ酸からプロトカテク酸の生産

# Bioconversion of ferulic acid to protocatechuic acid by *Corynebacterium glutamicum*

○岡井 直子[1]、増田 敬也[2]、竹嶋 康誠[1]、田中 耕生[3]、吉田 健一[1]、宮本 正教[2]、荻野 千秋[4]、近藤 昭彦[1] ([1]神戸大科技、[2]帝人、[3]神戸大自、[4]神戸大院工)
○ Naoko OKAI[1], Takaya MASUDA[2], Yasunobu TAKESHIMA[1], Kosei TANAKA[3], Ken-ichi YOSHIDA[1], Masanori MIYAMOTO[2], Chiaki OGINO[4], Akihiko KONDO[1] ([1]Grad.Sch.Sci.Tech.Innov.,Kobe Univ., [2]Teijin Limited, [3]Org.Adv.Sci.Tech.,Kobe Univ., [4]Dept.Chem.Sci.Eng.,Kobe Univ.)

目的）化石資源は有限であり、化成品・プラスチック原料のバイオマスからの生産が望まれる。本研究ではポリマー原料となる芳香族化合物をリグニン誘導体から生成することを目指し、プロトカテク酸（3,4-ジヒドロキシ安息香酸、PCA）のフェルラ酸からの微生物変換を検討した。プロトカテク酸は化成品のビルディングブロックや機能性ポリマー原料として有用な化合物である。プロトカテク酸はコリネ型細菌のコリスミ酸:ピルビン酸リアーゼ発現株において糖からコリスミ酸経路を経て菌体外に生産される[1,2]。一方標準株においては、PCA は β-ケトアジピン酸経路を経て代謝される。今回 *Corynebacterium glutamicum* の PCA 生産性株を宿主としフェルラ酸から PCA の変換を行った。
方法）*C. glutamicum* ATCC21420(F)株についてフェルラ酸、バニリン、バニリン酸(2mM)からの PCA 生成を検討した。次にコリネ型細菌由来のバニリン酸 o-デメチラーゼ(Van)を発現させ、フェルラ酸を添加して 30℃で好気条件にて 72 時間培養を行った。また宿主株についてゲノム配列を解読し PCA 関連遺伝子について標準株との比較を行った。
結果・考察）*C. glutamicum* ATCC21420 株はフェルラ酸とバニリン酸を添加した場合に菌体外に PCA を生成した。このときフェルラ酸を利用する過程ではバニリン酸の生成が認められた。本株はフェルラ酸の利用にフェニルプロパノイド分解経路を用いていることが示唆される。次に *C.efficiens* 由来の Van を発現させた *C. glutamicum* FVan 株は 7.5mM のフェルラ酸を添加したところ 48 時間でその 90%が PCA に変換された。また宿主株のゲノム上で *pca* クラスターは保存されていたが取り込み系に変異が認められた。
謝辞）本研究は文部科学省 科学技術振興調整費「バイオプロダクション次世代農工連携拠点の形成」の研究の一環として行われたものである。
1) 2015 年度農芸化学会大会要旨集（3A34p13）
2) Appl.Microbiol.Biotechnol.100(1),135-145(2016).

protocatechuic acid, ferulic acid, *Corynebacterium glutamicum*

講演番号：4C26a08
講演日時：3 月 20 日 11:15～ C 校舎 26 会場

# 海洋性テレフタル酸分解菌の分離と分解系遺伝子の解析

# Isolation of terephthalate-degrading marine bacteria, and analysis of their terephthalate-degrading genes

○澤岡 良太、岩木 宏明、長谷川 喜衛（関西大　化学生命工）
○Ryota SAWAOKA, Hiroaki IWAKI, Yoshie HASEGAWA (Kansai Univ.)

【目的】

陸棲細菌によるテレフタル酸の分解は、環境浄化技術の開発およびフェノール系化学品等の生産を目的に詳細に解析されている。一方、海洋性細菌によるテレフタル酸の分解についての報告は少ない。本研究では、物質生産に資する新規機能の開拓および海洋における環境浄化の発展を目的に海水からテレフタル酸分解菌を単離し、分解系遺伝子の解析を試みた。

【方法・結果】

石垣島沖、五島列島沖、越前沖から採取した海水から集積培養法でテレフタル酸資化性菌 5 菌株を分離した。16S rRNA 遺伝子配列の解析を行った結果、2 株が *Oceanicola* 属 (KU49D8 株、KU49E1 株)、1 株が *Maritimibacter* 属(KU49E5 株)、1 株が *Pseudooceanicola* 属(KU49F1 株)、1 株が *Marinovum* 属(KU49F3 株)に帰属された。海洋性細菌によるテレフタル酸分解系を解析するため、*Comamonas* 属のテレフタル酸 1,2-ジオキシゲナーゼのオキシゲナーゼコンポ―ネント大サブユニット遺伝子(*tphA2*)の部分断片を増幅する際に設計されたプライマーを用いた PCR を行った。その結果、すべての分解菌において、プライマーの位置から推定される約 300bp の断片の増幅が見られた。これらの断片の塩基配列を解析した結果、推定アミノ酸配列が、*Comamonas* sp. E6 株の TphA2 のものと 52～63%一致したことから、海洋性細菌は陸棲細菌と類似のテレフタル酸分解系を有することが示唆された。海洋性細菌のテレフタル酸分解系の全容を解明するため、KU49E1 株と KU49F3 株においてインバース PCR 法で周辺領域を増幅し、塩基配列を解析した結果、両菌株とも *Comamonas* 属のテレフタル酸からプロトカテキュ酸への変換に関与する酵素遺伝子と類似の遺伝群(*tphA2A3BA1*)を有していた。また、推定 IclR 型制御遺伝子および、膜輸送タンパク質をコードすると推定される遺伝子も有していた。現在、これらの遺伝子のテレフタル酸分解への関与を確かめるため *tphA2A3BA1* 発現大腸菌の構築を試みている。

terephthalate, marine bacteria, biodegradation

講演番号：4C26a09
講演日時：3 月 20 日 11:30～ C 校舎 26 会場

# シクロドデカノン分解菌の分離と分解系遺伝子の解析
# Isolation and genetic characterization of cyclododecanone degrading bacterium

○山本 泰誠、岩木 宏明、長谷川 喜衛（関西大化学生命工）
○Taisei YAMAMOTO, Hiroaki IWAKI, Yoshie HASEGAWA (Kansai Univ.)

【目的】長鎖ジカルボン酸の微生物合成法としては、*n*-アルカンを原料とする方法が知られている。大環状アルカンやそのアルコールおよびケトンの代謝経路は、長鎖ジカルボン酸合成の代替経路となりうる。これまでに、*Pseudomonas* 属および *Rhodococcus* 属の大環状アルコール分解系遺伝子の一部が報告されているが、いずれも全代謝酵素遺伝子の報告には至っていない。本研究では、土壌からシクロドデカノン分解菌を分離するとともに、代謝に関与する遺伝子の解析を行った。
【方法と結果】0.1%シクロドデカノンを唯一の炭素源として含む無機塩培地(pH7.0)を用い、集積培養を行い、土壌からシクロドデカノン分解菌 IH-73 株を分離した。IH-73 株は、カタラーゼ、オキシダーゼ陽性・非運動性のグラム陰性桿菌であり、12 員環以上のケトンおよびアルコールの資化性を有していた。16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統解析の結果、IH-73 株は *Phenylobacterium haematophilum* および *Phenylobacterium conjunctum* と最も近縁であった。しかしながら、糖および有機酸の資化性、生育可能温度などが異なっていることから、本菌株を *Phenylobacterium* sp.と同定した。

本菌株のシクロアルカノール分解系遺伝子を取得するために、*Pseudomonas* と *Rhodococcus* の大環状ケトンモノオキシゲナーゼおよび、それらの相同体のアミノ酸保存配列をもとに設計したプライマーを用いて PCR を行い、シクロアルカノンモノオキシゲナーゼ(CAMO)遺伝子の部分断片を取得した。この断片をプローブとしてサザンハイブリダイゼ―ション、コロニーハイブリダイゼ―ションを行い、約 3.8kbp の *Sma*I 断片を取得した。この断片の塩基配列を解析した結果、CAMO 遺伝子の全域、TetR 様遺伝子および機能未知遺伝子が存在した。取得した領域が大環状アルコール分解系に関与する領域であることを確かめるため、CAMO 発現大腸菌を構築し、シクロアルカノンに対する活性を測定した。その結果、CAMO 発現大腸菌の無細胞抽出液は、11 員環以上のシクロアルカノンに対する活性を示したことから、取得した領域は大環状アルコール分解系遺伝子の一部であることが明らかになった。

*Phenylobacterium*, cyclododecanone, cycloalkane

講演番号：4C26a10
講演日時：3 月 20 日 11:45～ C 校舎 26 会場

# 放線菌 P450 が触媒する新規の分子間カップリング反応の解析

# Exploration of Streptomyces genome sequences toward identification of novel cytochromes P450 capable of intermolecular oxidative C-C coupling reactions

○勝山 菜央、山西 健太、岡澤 敦司、小川 拓水、太田 大策（大阪府大）
○Nao KATSUYAMA, Kenta YAMANISHI, Atsushi OKAZAWA, Takumi OGAWA, Daisaku OHTA (OSaka Pref. Univ.)

シトクロム P450（P450）は P450 スーパーファミリーとして生物界に広く分布し，様々な有機化合物を基質とした一原子酸素添加反応を触媒するヘムタンパク質の総称である．放線菌はそれぞれの菌株が数十種の P450 遺伝子とともに複数の P450 電子伝達体遺伝子を持ち，これらは抗生物質や色素化合物等，多様な分子構造を有する二次代謝産物の生合成に関与する．例えば，*Streptomyces coelicolor* A3(2) 由来 CYP158A2 は，ポリケタイド生合成経路において flaviolin（2,5,7-trihydroxynaphthalene-1,4-dione）を基質とする分子間酸化的 C-C カップリング反応を触媒し，色素化合物の基本構造を与える．本研究では，P450 を生体触媒として利用し，多様な新規化合物骨格を創出することを目的として，酸化的 C-C カップリング反応を触媒しうる新規の放線菌 P450 を探索した．

CYP158A2 のアミノ酸配列を基に National Center for Biotechnology Information（NCBI）データベースで相同性検索を行い，酸化的 C-C カップリング反応を触媒すると推定される 16 種類の放線菌 P450 を選抜した．これらの P450 を昆虫細胞 - バキュロウイルス発現系において発現させ，高等植物ミトコンドリアのフェレドキシンとフェレドキシン還元酵素との再構成系に供試した．芳香環や複素環を有する 426 種類の基質候補化合物に対して，酵素反応溶液の吸収スペクトル変化と NADPH 消費を指標として P450 反応の進行をスクリーニングしたところ，複数の P450 と基質化合物の組合せにおいて色素産生能を特定することができた．これらの酵素反応液の LC-MS 分析によって，新規の分子間酸化的 C-C カップリング反応が進行したことを確認した．

Cytochrome P450, Streptomyces, intermolecular oxidative C-C coupling reactions

講演番号：4C26a11
講演日時：3 月 20 日 12:00～ C 校舎 26 会場

# タンデム酵素反応を活用したバイオプロセスによる(2*R*)-ヒドロキシアミノ酸の生産

# Production of (2*R*)-hydroxyamino acids by bioprocess using tandem enzyme reaction

日比 慎[1]、○間中 千尋[1]、角田 洋輔[2]、北澤 宏明[2]、岸本 高英[2]、杉山 明生[2]、小園 祥子[1]、高橋 里美[1]、小川 順[1] ([1]京大院・農、[2]東洋紡)

Makoto Hibi[1], ○Chihiro Kenchu[1], Yosuke Sumida[2], Hiroaki Kitazawa[2], Takahide Kishimoto[2], Akio Sugiyama[2], Shoko Kozono[1], Satomi Takahashi[1], Jun Ogawa[1] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]TOYOBO CO., LTD.)

【目的】

ヒドロキシアミノ酸は、機能性食品、化粧品、農薬、医薬品の原料として有用な化合物である。幾つかの 2*S* 体ヒドロキシアミノ酸の生産に関しては、微生物や酵素による触媒反応を用いた効率的なバイオプロセスが開発されており、産業化に向けた検討が進められている。一方、効率的生産法が未確立な 2*R* 体ヒドロキシアミノ酸については、現時点でその機能性に関する知見がほとんどない。そこで本研究では、複数の酵素触媒を用いたタンデム反応による 2*R* 体ヒドロキシアミノ酸のバイオプロセス生産法の構築を検討した。高光学純度の 2*R* 体ヒドロキシアミノ酸を調製して評価・解析することで、有用な機能性を持つ新規分子種を開拓することを目的としている。

【方法・結果】

*Burkholderia ambifaria* AMMD 株由来 *N*-スクシニル-L-アミノ酸ヒドロキシラーゼ（SadA）、*Chloroflexus aurantiacus* 由来 *N*-スクシニルアミノ酸ラセマーゼ（NSAR）、*Cupriavidus* sp. P4-10-C 株由来 *N*-スクシニル-D-アミノ酸デスクシニラーゼ（DSA）を使用したタンデム酵素反応系を構築した。ここでは SadA、NSAR、DSA をそれぞれ発現した組み換え大腸菌の菌体を触媒として用いた。本タンデム酵素反応系において、まず SadA の作用により *N*-スクシニル-(2*S*)-アミノ酸の 3 位が水酸化され *N*-スクシニル-(2*S*)-3-ヒドロキシアミノ酸が生じる。次いでこの *N*-スクシニル-(2*S*)-3-ヒドロキシアミノ酸の 2 位が NSAR の作用によりラセミ化され、結果として生じた *N*-スクシニル-(2*R*)-3-ヒドロキシアミノ酸が DSA の作用を受けて(2*R*)-3-ヒドロキシアミノ酸へと変換される。上記の全過程において、基質から(2*R*)-3-ヒドロキシアミノ酸への変換における理論収率は 100%となる。

これまで本反応系により様々な(2*R*)-3-ヒドロキシアミノ酸の生産に成功しており、例えば(2*R*,3*S*)-3-ヒドロキシイソロイシン、(2*R*,3*S*)-3-ヒドロキシロイシン、(2*R*)-3-ヒドロキシバリン、(2*R*,3*S*)-3-ヒドロキシノルロイシン、(2*R*,3*S*)-3-ヒドロキシノルバリンなどがグラムスケールで調製可能となった。ここで得られた(2*R*)-3-ヒドロキシアミノ酸類は高い光学純度を保持していた。

(2*R*)-hydroxyamino acid, *N*-succinylamino acid racemase, *N*-succinyl-D-amino acid desuccinylase

発表責任者：小川順（ogawa@kais.kyoto-u.ac.jp）

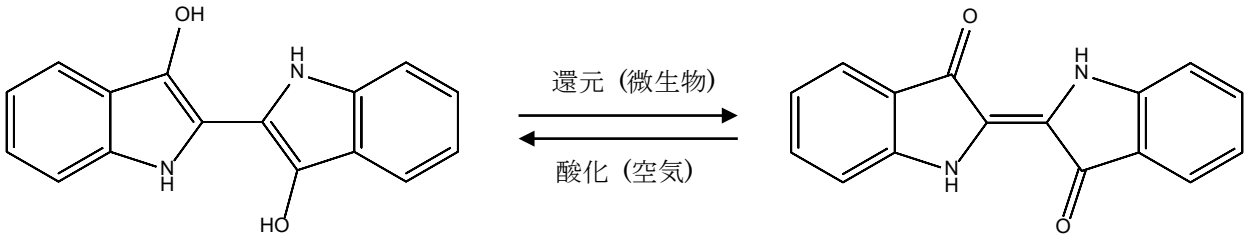
講演番号：4C26a12
講演日時：3 月 20 日 12:15～ C 校舎 26 会場

# インジゴ還元菌の探索及び定量的評価法を用いる機能解析
# Screening of indigo-reducing bacteria and the quantitative analysis

○久郷 将見[1]、竹内 道樹[2]、四方田 和哉[3]、阪本 鷹行[3]、櫻谷 英治[3]、小川 順[1] ([1]京大農・応用生命、[2]京大農・産業微生物、[3]徳大・生物資産)
○Masami KUGOU[1], Michiki TAKEUCHI[2], Kazuya YOMOTA[3], Takaiku SAKAMOTO[3], Eiji SAKURADANI[3], Jun OGAWA[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Lab. Ind. Microbiol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [3]Grad. Sch. Bioind, Tokushima Univ.)

【目的】

日本の伝統産業である藍染めは、タデアイ葉由来インジゴの微生物還元を利用して行われている。藍色成分である不溶性色素のインジゴは、アルカリ条件下で微生物によって水溶性のロイコインジゴへと還元される。現在、インジゴ還元菌の単離に成功した報告[1)]はあるが、インジゴ還元能を定量的に評価した報告はない。そこで本研究では、インジゴ還元菌の探索とインジゴ還元能の定量法の確立を行い、確立した定量法を用いて、探索により得られたインジゴ還元菌の機能解析を行うことを目標とした。




インジゴ（酸化型）
600 nm に吸収極大あり

ロイコインジゴ（還元型）

【方法・結果】

藍染めの染色液やすくも、乾燥葉などを菌の分離源とし、炭酸ナトリウムで pH10 に調整した標準寒天培地（顆粒）「ニッスイ」を用いて 28℃、嫌気条件下で培養し、154 株の微生物を単離した。

単離した微生物について、0.03%インジゴを含むアルカリ標準培地で 3 日間培養を行い、インジゴ還元能を評価した。評価方法としては、遠心後の培養液上清に溶けているロイコインジゴを空気に晒すことでインジゴへ酸化させ、600 nm の吸光度を測定することでインジゴ還元能を定量的に評価した。その結果、インジゴ還元能の高い 10 株の菌株の所得に成功した。最もインジゴ還元能の高い SH2-1 株について、16S rRNA 解析を行ったところ、*Alkalibacterium pelagium* との 99%の相同性が見出された。さらに、得られたインジゴ還元菌についてインジゴ還元の最適条件の検討を行った。

1) Aino K. et al., FEMS Microbiol Ecol 74, 174-183. (2010)

indigo, indigo reduction, indigo fermentation

発表責任者：小川　順（ogawa@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4J27a01
講演日時：3 月 20 日 09:20～ J 校舎 27 会場

細菌由来のデアミナーゼ―デハロゲナーゼ融合タンパク質の機能解析
Functions of deaminase-dehalogenase fusion protein in bacteria
○佐藤 あや華、加藤 広海、大坪 嘉行、津田 雅孝、永田 裕二（東北大学・大学院生命科学研究科（院生命科））
○Ayaka SATO, Hiromi KATO, Yoshiyuki OHTSUBO, Masataka TSUDA, Yuji NAGATA (Tohoku Univ.)

【背景・目的】ハロアルカンデハロゲナーゼ（HLD）は、様々なハロアルカン類およびその関連物質に対する加水分解的脱ハロゲン活性を有し、一般に基質特異性が広いことから環境浄化や有用物質生産への応用が期待されている。HLD は、当初、ハロアルカン系環境汚染物質分解資化細菌のみが有する特殊性の高い酵素と考えられていたが、近年、ゲノム情報の蓄積により、比較的広範な細菌ゲノムにそのホモログ遺伝子が存在することが明らかになり、それらのうちいくつかのものについては、生化学的解析により実際に新規性の高い反応特性を有する HLD をコードすることが明らかになっている。しかし、これらゲノム情報から見出された HLD 遺伝子の宿主細菌細胞における生理的意義は未だ不明である。*Betaproteobacteria* に属する PCB/biphenyl 分解細菌 *Acidovorax* sp. KKS102 株ゲノムにも、HLD ホモログ遺伝子 *dahX* が見出されたが、本遺伝子はこれまでに解析が行われた HLD 遺伝子とは異なり、tRNA の修飾に関与するデアミナーゼ (DAM) ホモログと HLD ホモログが一繋がりの融合タンパク質としてコードされていた。近縁の *Betaproteobacteria* 株でも同様の構造を持つ遺伝子が存在することから、融合タンパク質として存在することに何らかの意義があると考えられる。本研究では、本 DAM-HLD 融合タンパク質の機能解析を行った。
【方法・結果】KKS 株の *dahX* 遺伝子完全破壊株を作製した。本破壊株は、野生型株に比べ、完全培地での生育能が低下した。さらに、本 *dahX* 破壊株への各種プラスミドを用いた相補実験により、HLD domain は完全培地での生育には影響を及ぼさず、DAM domain が生育に重要であることが示された。さらに、これらの株を用いて、過酸化水素の存在や低温などの環境ストレス条件下での生育に DahX あるいは各 domain が及ぼす影響について検討している。一方、DahX 全長, DAM domain, HLD domain の C 末端に各々6xHis-tag を付与したタンパク質を大腸菌中で大量発現し、常法により精製を行った。各精製タンパク質について、18 種類の有機ハロゲン化合物に対する HLD 活性測定を行った結果、DahX は、塩化物よりも臭化物に対して比較的強い活性を示した。HLD domain のみでも DahX と同様の活性が観察され、両者に顕著な違いは見られなかった。なお、DAM domain は HLD 活性を示さなかった。次に、DAM domain の基質と予想される KKS102 株の $tRNA^{Arg}\_A_{34}CG$ の *in vitro* 転写系を構築した。DAM domain の大腸菌ホモログである TadA は $tRNA^{Arg}\_A_{34}CG$ の 34 位の A を脱アミノ反応により inosine (I) に変換し、本修飾の有無は塩基配列解析で検出可能である。現在、人工合成した $tRNA^{Arg}\_A_{34}CG$ に対する DahX および各 domain の DAM 活性を検討中である。

Acidovorax, deaminase, dehalogenase

発表責任者：永田裕二（aynaga@ige.tohoku.ac.jp）

講演番号：4J27a02
講演日時：3 月 20 日 09:35～ J 校舎 27 会場

*Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株のゲノム構造解析と環境汚染物質分解能の安定化
Genomics analysis of environmental pollutant degradation bacterium *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 and improvement on the degradation activity.
○高 未麗[1]、村澤 友紀恵[1]、松村 吉信[1,2]（[1]関西大・生命生物工、[2]関西大・ORDIST）
○Miryo KOH[1], Yukie MURASAWA[1], Yoshinobu MATSUMURA[1,2] ([1]Dept. Life science & Biotech., Kansai Univ., [2]ORDIST, Kansai Univ.)

【背景】ポリカーボネート樹脂などの原料であるビスフェノール A （BPA）は、内分泌撹乱物質として生態系に悪影響を及ぼすことが危惧されている。近年では、水環境でのマイクロプラスチックによる汚染も深刻化し、これらを併せた対策が求められている。当研究室では BPA を完全分解する *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株を単離し、本菌株が BPA 以外にもビスフェノール類化合物やビスフェニル類、有機塩素系化合物なども分解できることから、広範な環境汚染物質分解菌として活用できるものと考えている。これまでの研究で、BPA 分解関連遺伝子 *bisdAB*、*adh*、*lsd*、*bisdF*、さらに有機塩素化合物分解に関わる *had* がプラスミドの一つである pBAR1 にコードされていることを明らかにした。一方、AO1 株から BPA 分解能を失った AO1L 株が単離され、AO1 株の分解能の不安定性が実用化への障害となっており、pBAR1 の遺伝子構造の不安定性がその一因であることも確認された。本研究では、次世代シーケンサーを用いて AO1 株のゲノム構造を明らかにし、BPA を含む環境汚染物質分解関連遺伝子の特定と環境汚染物質分解能の向上並びにその安定化を目的とした。
【方法と結果】BPA 分解関連遺伝子（*bisdAB*、*adh*、*lsd*、*bisdF*、*had*）を保持する組換えプラスミドを AO1 株に導入し、BPA 分解能の向上を試みたが、顕著な BPA 分解能の増強は確認できなかった。一方、AO1L 株に組換えプラスミドを導入した結果、BPA 分解能が部分的に回復した。次に AO1 株のゲノム DNA を、次世代シーケンサー（PacBio RSⅡ）を用いて解読し、Hierarchical Genome Assembly Process 3 で解析した結果、6 個の環状化 DNA に集約され、Chromosome 1 (約 3.7 Mbp)と、Chromosome 2 (約 0.96 Mbp)、Plasmid 1 (約 260 Kbp)、Plasmid 2 (110 Kbp)、Plasmid 3 (pBAR1) (80 Kbp)、Plasmid 4 (66 Kbp) で構成されていた。また、この 4 つのプラスミドの細胞内コピー数は 3 以下と予想された。BPA 分解に関わる *bisdB* と相同性のある Cytochrome P450 遺伝子は 6 つ存在していたが、BPA 分解に関与していたのは *bisdB* のみであった。RAST server (NMPDR) で遺伝子機能を予測したところ、70 個の芳香族化合物分解関連遺伝子が推定された。この結果から、BPA 代謝中間体 4-Hydroxybenzoate (4-HBA) は *pobA* (Chromosome 2) と *bisdF* (pBAR1) にコードされた 4-HBA monooxygenase によってプロトカテク酸に変換後、β-ケトアジピン酸経路でアセチル-CoA とサクシニル-CoA に変換されるものと予想された。今後はさらなる BPA 分解関連遺伝子の特定とそれらの発現量比較を行い、分解能の不安定性の原因を特定し、環境汚染物質分解能の向上を試みる予定である。

bisphenol A biodegradation, Genomic structural analysis, *Sphingomonas*

発表責任者：松村吉信（ymatsu@kansai-u.ac.jp）

講演番号：4J27a03
講演日時：3 月 20 日 09:50～ J 校舎 27 会場

*Pseudomonas stutzeri* NT-I のセレン酸還元関連遺伝子群の同定と解析
Identification and characterization of genes related to selenate reduction in *Pseudomonas stutzeri* NT-I

○黒田 真史[1]、櫻井 紫乃[1]、山下 光雄[2]、池 道彦[1]([1]阪大院・工、[2]芝浦工大・工)
○Masashi KURODA[1], Shino Sakurai[1], Mitsuo Yamashita[2], Michihiko Ike[1] ([1]Osaka Univ., [2]Shibaura Inst. Tech.)

【背景・目的】セレンは半導体材料等として利用されるレアメタルである一方、水相での主な形態であるセレン酸及び亜セレン酸は毒性が高いため、廃水からのセレンの除去・回収技術の確立が望まれている。我々がセレン製錬工場排水溝より単離した細菌 *Pseudomonas stutzeri* NT-I は、好気及び嫌気条件下でセレン酸を亜セレン酸に還元し、また好気条件下でさらに亜セレン酸を水に不溶な元素態セレン及び揮発性のセレン化メチル化合物にまで段階的に還元する高いセレン代謝能力を持ち、セレン含有排水の生物学的処理プロセスへの適用が期待されることから、そのセレン代謝の分子機構は非常に興味深い。本研究では、NT-I 株によるセレン代謝の第一段階であるセレン酸還元に関わる遺伝子群を特定し、その機能を明らかにすることを目的とした。
【結果･考察】接合伝達性トランスポゾン mini-Tn*5* によるランダムな遺伝子破壊により得られた NT-I 株のセレン酸還元能変異株ゲノム中の mini-Tn*5* 挿入位置近傍には、4 つの ORF から成るオペロンと 3 つの ORF から成るオペロンが存在しており、これらをそれぞれ *serABDC* および *serXSR* として、セレン酸還元との関連を解析した。*serABDC* は既報のセレン酸還元酵素遺伝子群と極めて高い相同性を示し、NT-I 株においても同様にセレン酸還元酵素をコードしているものと推測された。一方、*serXSR* はそれぞれ、二成分制御系の溶質結合タンパク質、ヒスチジンキナーゼ、およびレスポンスレギュレーターをコードするものと推定された。相同組換えにより *serXSR* を破壊した変異株のセレン酸還元能力は、好気条件下では著しく低下し、嫌気条件下では全く還元が生じなかった。リアルタイム PCR により *serA* の転写量を測定したところ、野生株ではセレン酸を添加した際に *serA* の転写が著しく促進されたのに対し、*serXSR* 破壊株では、セレン酸の有無によらず抑制されることが明らかとなった。これらの結果より、*serXSR* はセレン酸の存在下でセレン酸還元酵素遺伝子群 *serABDC* の転写を正に制御する働きを持つ、新規の二成分制御系センサー／レギュレーターをコードするものと推定された。
【謝辞】本研究は JSPS 科研費 No. 22310047 及び No. 15K16145 助成を受けて行われた。

selenium, anaerobic reduction, *Pseudomonas stutzeri*

発表責任者：黒田真史（kuroda@see.eng.osaka-u.ac.jp）

講演番号：4J27a04
講演日時：3 月 20 日 10:05～ J 校舎 27 会場

# Clarithromicin と Levofloxacin の藻類に対する毒性

# Toxicity of Clarithromicin and Levofloxacin to algae growth

○浅香 貴啓[1]、川瀬 俊吾[2]、清水 佑一[2]、新井 真子[1]、坂本 亮[1]、長坂 征治[1,2,3] ([1]東洋大学 生命科学、[2]東洋大院 生命科学、[3]東洋大学生命環境科学研究センター)
○Takaaki ASAKA[1], Syungo KAWASE[2], Yuuichi SIMIZU[2], Mako ARAI[1], Ryou SAKAMOTO[1], Seiji NAGASAKA[1,2,3] ([1]Faculty of Life Sciences, Toyo University, [2]Graduate School of Life Sciences, Toyo University, [3]Research Center for Life and Environmental Sciences)

1928 年に Alexander Fleming が世界で初めてアオカビ *Penicillium notatum* からペニシリンを発見して以来、様々な抗生物質が開発され実用化し、人類の医療に大きな変化をもたらした。今日、抗生物質は人に対して使用されるだけでなく、畜産・水産業などにおいても品質の維持や安定供給のために膨大な量が使用され我々の生活になくてはならないものとなっている。一方で、環境中へ流出した抗生物質の生態系への影響は未知な部分が多く、抗生物質の多くは原核生物を標的としているが、真核藻類に対しても毒性を持つことが示唆され、河川や下水処理場での検出例が報告されている。本研究では、生態系のなかで生産者に位置している藻類に対する抗生物質の影響について、基礎的なデータを収集することを目的として行った。

供試生物としてムレミカヅキモ *Pseudokirchneriella subcapitata* を使用し、抗生物質である Clarithromicin(CAM)と Levofloxacin(LVFX)を用いて毒性試験を行った。本試験では、3 日間の前培養を 2 度行った後、細胞を $1.0\times10^5$ cell/ml になるように加え、そこに抗生物質をそれぞれ曝露し毒性評価を行った。生育については分光光度計による吸光度の測定(660 nm)で評価を行い、抗生物質曝露による生育阻害を評価した。また、抗生物質が原核生物を標的としていることから藻類細胞内のクロロフィル・ミトコンドリアへの影響を評価するため、ICP-MS による細胞内の Zn、Mn、Fe 含有量分析、蛍光試薬 DCFH-DA を用いた細胞内の酸化ストレス分析を行った。

ムレミカヅキモの生育は CAM 曝露区では、曝露濃度 7 μg/l で生育が半数減少し、10 μg/l の濃度ではほとんど生育が認められなかった。LVFX 曝露区では曝露露濃度 1250 μg/l で生育が半数減少した。細胞内 Mn、Fe 含有量は、両抗生物質曝露区とも曝露露濃度の上昇に伴った含有量の上昇が認められた。CAM、LVFX の曝露による細胞内の酸化ストレス値上昇は認められなかった。

ICP-MS による分析で、CAM、LVFX の曝露によって、細胞内の Mn、Fe 含有量が曝露濃度の上昇に伴って上昇していたことから、Mn と Fe を欠乏させた培地での藻類生育に CAM、LVFX がどの様に影響するのかを調べた。Mn 欠乏の培地条件における CAM 曝露時の生育阻害試験では、10 μg/l の区画において通常培地よりも生育阻害が低く、生育が回復するような結果が得られた。これに対して、Fe 欠乏条件での CAM 曝露時の生育阻害試験では、10 μg/l の曝露濃度では通常の培地とほぼ同様の阻害率となった。この結果から、CAM が藻類に対して毒性を持つうえで細胞内の Mn 量が深くかかわっている可能性が示唆された。

Toxicity, Clarithromicin, Levofloxacin

講演番号：4J27a05
講演日時：3 月 20 日 10:20～ J 校舎 27 会場

渡良瀬遊水池から単離された藻類の銅に対する応答評価
Evaluation of $Cu^{2+}$ responses in algae which were isolated from Watarase basin
○清水 佑一[1]、川瀬 俊吾[1]、浅香 貴啓[2]、柏田 祥策[1,2,3]、長坂 征治[1,2,3] ([1]東洋大院生命科学、[2]東洋大生命科学、[3]東洋大学生命環境科学研究センター)
○Yuuichi SHIMIZU[1], Syungo KAWASE[1], Takaaki ASAKA[2], Syosaku KASHIWADA[1,2,3], Seiji NAGASAKA[1,2,3] ([1]Toyo Graduate School of Life Sciences, Toyo University, [2]Toyo University, [3]Research Center for Life and Environmental Sciences)

【背景と目的】明治時代、銅は主要な輸出品であり日本の銅生産を支えていたのが栃木県の足尾銅山である。足尾銅山は全国一の産銅量を誇っていたが、銅の生産量が増加する中で足尾銅山を源とする渡良瀬川で鮎などの川魚の大量死などの鉱毒被害が見られるようになっていった。さらに 1890 年に暴風雨による洪水で渡良瀬川周辺に鉱毒水が流出し周辺農地にまで鉱毒被害が拡大した。洪水による被害を抑えるという目的で 1907 年に渡良瀬遊水地が誕生した。その後 1958 年の水質規制法の制定、1973 年の足尾銅山の閉山をうけ鉱毒被害は収束していくこととなった。本研究では前述したような過去を持つ渡良瀬遊水地の生物相の環境への適応について、鉱毒流出の主であった銅に着目し生産者である藻類を対象として解析することを目的とした。
【方法】藻類の銅曝露への応答を評価するために、まずモデル生物であるムレミカヅキモに対して $CuSO_4$ 濃度を 1～50 μM に設定し、$CuSO_4$ 曝露条件下での、生育試験、細胞内金属含有量測定、酸化ストレス試験の三つの指標を用いた。また、実際の環境中では銅はフミン酸などの有機物と錯体を形成しているため培地中に含まれる二価金属のキレート剤である EDTA の有無による銅の毒性への影響についても調査した。さらに渡良瀬遊水地から単離した藻類に対して、$CuSO_4$ を曝露し生育試験を行った。
【結果と考察】EDTA 存在下での $CuSO_4$ 曝露条件における生育試験では、$CuSO_4$ 曝露濃度の上昇に伴い、生育は阻害され、25 μM で約 50%阻害された。また細胞内の銅濃度は銅曝露濃度の上昇に伴い上昇していた。その他の金属についても解析したところ、細胞内のマンガン濃度は銅濃度にみられる変化と似た傾向を示し、鉄濃度と亜鉛濃度は銅曝露濃度が上昇するに従い逆に減少していた。細胞内の酸化ストレス量に銅曝露による大きな変化は認められず、対照区と同様に培養時間の経過に伴う上昇のみが観察された。一方、EDTA 非存在下での生育試験では、銅の曝露濃度が低濃度の区画（1 μM、5 μM）では対照区に比べて高い生育が認められたが、それ以上の銅曝露濃度では濃度の増加に伴い生育の低下が認められた。EDTA 存在下で培養した時と同様に、細胞内銅濃度は銅曝露上昇と伴に上昇し、鉄濃度、亜鉛濃度は銅曝露濃度の上昇につれて減少していた。一方で、細胞内のマンガン濃度は、EDTA 存在下で培養した細胞の結果とことなり、銅曝露濃度の上昇に伴い減少していた。このことから、銅の藻類への影響を調べるうえでキレート剤の影響を考慮しなければならないことが示唆され、現在これらの結果を踏まえて、渡良瀬遊水地から単離した藻類について評価、解析を進めている。

Heavy metal toxicity, Algae growth, Watarase basin

講演番号：4J27a06
講演日時：3 月 20 日 10:35～ J 校舎 27 会場

# Study on individual and combine effects of Fluoranthene, Phenanthrene and Mannitol on Marigold

○ Wahdatullah KHPALWAK[1,3], Sh. M. ABDEL-DAYEM[1,2], Kazuhiko TAKEDA[1], Hiroshi SAKUGAWA[1] ([1]Biosph. Sci., Hiroshima Univ. Japan, [2]Fac. of Agri. Kafrelsheikh Univ. Egypt, [3]Fac. of Agri. Nangarhar Univ. Afghanistan)

Marigold plants (*Calendula officinalis*) grown in 30 cm diameter pots were fumigated with 10 µM Fluoranthene (FLU) and Phenanthrene (PHE), and 1m M Mannitol (MANN) solutions individually and in combination for 40 days in growth chamber under natural conditions in Hiroshima University. Their effects on the plants were evaluated by measuring selected eco-physiological and bio-chemical parameters. $CO_2$ uptake and water vapor exchange were measured using (Li-6400, Li-cor), and chlorophyll contents (a, b, a/b and total), fresh, turgid and dry weight, relative water content and leaf water deficit, enzyme activities (Catalase (CAT) and Ascorbate Peroxidase (APX)), and Proline contents were measured using spectrophotometer (UV-VIS 2400, Shimadzu Co., Japan).

Results showed that FLU application significantly decreased photosynthesis at near-saturating irradiance, stomatal conductance, and $CO_2$ uptake and chlorophyll contents while PHE application did so with lesser extent compared with the control. Highest CAT and APX enzymes activities and lowest Proline contents in the treatments fumigated with only FLU indicates the generation of Reactive Oxygen Species (ROS) by FLU. The negative effects of the ROS generated by FLU and PHE were mitigated by the addition of MANN (OH-radical scavenger) to the solutions. The treatments fumigated with PAHs containing MANN significantly reduced the generation of ROS which thus resulted in lesser negative effect on the plants compared with the treatments containing only PAHs. From the findings it is evident that MANN had scavenging activity against ROS generated by FLU and PHE fumigation in the plants.

PAHs, Mannitol, Marigold plants

発表責任者：Wahdatullah KHPALWAK（khpalwak.uasd@gmail.com）

講演番号：4J27a07
講演日時：3 月 20 日 11:00～ J 校舎 27 会場

# 大気汚染物質(硫酸、フルオランテン)および紫外線(UV-A)がイチゴ(サチノカ)に及ぼす複合影響評価

# Individual and combine effects of air pollutants (Sulfuric acid, Fluoranthene) and ultraviolet light (UV-A) on Strawberry (SATINOKA)

○上野 豊碩、佐久川 弘（広島大学生物圏科学研究科）
○Hoseki UENO, Hiroshi Sakugawa (Hiroshima Univ.)

【目的】平成 21 年に大気において微小粒子状物質(PM2.5)の測定項目が新たに設定されて以降年々測定局数は増加し(平成 26 年度：672 局)、微小粒子状物質の大気常時監視がおこなわれている。微小粒子状物質などの大気中の汚染物質はヒトや植物などの生物に大きな影響を与えるのでこれまで多くの研究がなされている。大気汚染物質のなかで $SO_2$ などは高度経済成長以降に大気中濃度の減少が見られるが、微小粒子状物質の濃度低下はあまり見られず、また中国などの新興国から発生した汚染物質が日本に飛来することにより、その環境基準の達成がより困難なものとなっている。

一方、紫外線も生物に影響を与え、大気中の粉塵の減少により高度経済成長以降少しずつ増加を示している。今回、硫酸イオンや多環芳香族炭化水素(フルオランテン)、紫外線に注目し、それらがイチゴに与える影響を調べた。

【方法】今回、サチノカという品種を使用し、処理区を硫酸+UV-A(以後 S+UV)処理区、フルオランテン(F)処理区、フルオランテン+UV-A(F+UV)処理区、硫酸+フルオランテン(S+F)処理区、硫酸+フルオランテン+UV-A(S+F+UV)処理区、対照区の 6 つ、1 処理区ごとに 5 つポットを置いた。次に、硫酸とフルオランテンの暴露量を 1 ポット 5ml としそれを朝と夕方 2 回、週 5 回行い、2016 年 6 月 10 日から 10 月 8 日まで行った。UV の照射は暴露の間に行い、1 日 6 時間照射した。1 日 6 時間は広島県の年日照時間平均を 1 日平均に割った時間である。

測定項目は LI-6400XT(LI-COR 社)の光合成速度と気孔開閉度、葉内二酸化炭素濃度、SPAD502(コニカミノルタ社)の SPAD 値、MINI-PAM(WALZ 社)の最大光量子収率(Fv/Fm)を測定し、また DMF 法を用いて分光光度計(UV－VIS2400PC、島津製作所社)でクロロフィル a および b、カロテノイド、さらに 1 株当たりの葉数、1 番内側の葉の茎径、葉幅、葉厚をデジタルノギス(ミツトヨ社)で調べた。

【結果】今回の実験では SPAD 値と最大光量子収率で対照区とそれ以外に処理区で有意な差を計測し、また気孔開閉度では S+F 処理区で、葉内二酸化炭素濃度では S+F+UV 処理区で、クロロフィル a とカロテノイドでは F 処理区で、葉幅では F と F+UV、S+F、S+F+UV 処理区で、葉厚では F と S+F 処理区で対照区に有意な差がみられた。UV-A の効果がみられたのは最大光量子収率のみで有意な低下が見られたがそれ以外では有意な差はあまり見られなかった。これらの結果から、フルオランテンの影響は顕著であるが、UV-A の影響は明瞭ではなかった。

Air pollution, Ultraviolet A, Strawberry

発表責任者：上野豊碩（m161562@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：4J27a08
講演日時：3 月 20 日 11:15～ J 校舎 27 会場

嫌気性フェナントレン分解菌の単離
Isolation of anaerobically phenanthrene degrading bacteria
○今西 伸政、井上 謙吾、渡邊 史子（宮大院農）
○Nobumasa IMANISHI, Kengo INOUE, Fumiko WATANABE (Miyazaki Univ)

【目的】　フェナントレンは芳香環を 3 つ含む多環芳香族炭化水素の一つであり、石油精製や木材・バイオマスの不完全燃焼等から生成される。また、フェナントレンは水生環境有害性・難分解性を有することが知られており、アメリカ合衆国の環境保護庁が人為的に有害である可能性のある特定汚染物質として指定している。これまでの知見により、フェナントレンは微生物による代謝を受けることが知られており、好気性フェナントレン分解においては代謝経路が解明されており、分解代謝系遺伝子の特定等の研究が進んでいる。しかし、嫌気性フェナントレン分解においては分解菌の単離や代謝経路についての知見は極めて少ない。本研究では、フェナントレン嫌気分解を行う菌の単離と分解菌の特徴付けを行った。
【方法・結果】　宮崎県の八重川、加江田川等の河川底泥を 12 サンプル採取し、電子受容体を不溶性 Fe（Ⅲ）、電子供与体をフェナントレンとした培地に嫌気条件下で集積培養を行った。その後、集積培養液を、電子受容体をフマル酸（終濃度 40 mM）、電子供与体をフェナントレン（終濃度 280 mM）とした培地に展開した。形成されたコロニーのうち、フェナントレン分解により形成されるクリアゾーンの確認によって、フェナントレン分解菌のスクリーニングを行った。結果、培養約 1 ヶ月でクリアゾーンを形成し、シングルコロニーを上記のフェナントレン寒天培地に植え継ぎを行ってもクリアゾーンを形成した株を YPH02 株と命名し、後の解析に用いた。
YPH02 株の 16S rRNA 遺伝子配列を解析した結果、最も近縁なもので *Clostridium* 属細菌と 98.9%の相同性が確認された。次に、YPH02 株のフェナントレン以外の化合物の代謝能力を確認するため、唯一の電子供与体としてベンゼン、トルエン、酢酸、乳酸、唯一の電子受容体をクエン酸 Fe（Ⅲ）（可溶性の鉄（Ⅲ））とした培地に YPH02 株を植菌・培養した。その結果、ベンゼン、トルエン、酢酸、乳酸全ての電子供与体において、培養約 100 日でクエン酸 Fe（Ⅲ）の還元が確認された。また、YPH02 株に唯一の電子供与体としてフェナントレン、唯一の電子受容体としてクエン酸 Fe（Ⅲ）とした培地に植菌・培養した結果、培養 15 日目には Fe（Ⅲ）が還元されたことによって生じる Fe（Ⅱ）の濃度が上昇していた。現在、培地中のフェナントレンの定量を行い、YPH02 株のフェナントレン分解能力について解析している。

anaerobic degradation, polycyclic aromatic hydrocarbon, phenanthrene

講演番号：4J27a09
講演日時：3 月 20 日 11:30～ J 校舎 27 会場

ポリヒドロキシアルカン酸分解微生物が化学合成生分解性高分子の環境分解に与える影響
Environmental degradation of a chemosynthetic-biodegradable polymer by polyhydroxyalkanoate-degrading microbes.
○鈴木 美和、室井 文篤、風早 潤一朗、石井 成明、橘 熊野、粕谷 健一（群大院理工）
○Miwa SUZUKI, Fumihiro MUROI, Jun-ichiro KAZAHAYA, Nariaki ISHII, Yuya TACHIBANA, Ken-ichi KASUYA (Gunma Univ.)

【目的】ポリヒドロキシブチレート(P(3HB))に代表される微生物産生脂肪族ポリエステル(PHA)は微生物が菌体外に生産するP(3HB)分解酵素により加水分解を受ける。当研究グループは，P(3HB)分解酵素がPHA以外に化学合成脂肪族ポリエステルであるポリエチレンスクシナート(PESu)を加水分解することを明らかにした。他方で，PESu と PHAとの環境分解性は一致しておらず，特に海洋での生分解速度は大きく異なる。本研究ではこの原因を解明するために，全国各地の土壌，淡水および海洋環境中に存在するP(3HB)分解微生物およびPESu分解微生物の分布、種類および各高分子分解酵素を調べた。
【結果】土壌および淡水環境中からはP(3HB)分解微生物とPESu分解微生物の双方が検出された。一方，海洋環境中ではP(3HB)分解微生物は検出されたが，PESu 分解微生物は検出されなかった。本研究で単離されたP(3HB)分解細菌は Actinobacteria，ProteobacteriaおよびFirmicutes 門に属しており，分類学的な偏りはなかった。他方，PESu分解細菌の大部分は，Firmicutes門 *Bacillus*属の細菌から構成されていた。PESu分解真菌は全て Ascomycota門に属していたが、PESu分解細菌種のような属の偏りはなかった。
P(3HB)分解微生物種および PESu分解微生物種を用い、互いの高分子の分解活性を評価した。P(3HB)分解能力でスクリーニングされたすべての細菌がPESuを分解できなかった。また，ほぼ全てのPESu分解細菌がP(3HB)分解能を有していなかった。PESu分解細菌種の大部分を占める*Bacillus*属の特徴付けの結果から，これらの細菌種はP(3HB)分解酵素ではなく，リパーゼを用いてPESu を分解すると考えられる。一方，PESu分解能でスクリーニングされた全ての真菌種はP(3HB)を分解した。更に，PESu分解真菌が生産するP(3HB)分解酵素とPESu加水分解酵素の双方の特徴は一致した。
以上の結果から，PESu 分解細菌群と P(3HB)分解細菌群は一部を除き一致していておらず，P(3HB)分解細菌は本来の基質ではないPESuに対し，P(3HB)分解酵素を生産しないが，真菌種ではP(3HB)分解真菌の一部がP(3HB)分解酵素を生産しPESuを加水分解することが明らかとなった。これらのことが、P(3HB)とPESuの環境分解性の差異の原因と結論付けられる。

Biodegradable polymer, Polyhydroxyalkanoate depolymerase, Environmental degradation

発表責任者：粕谷健一（kkasuya@gunma-u.ac.jp）

講演番号：4J27a10
講演日時：3 月 20 日 11:45～ J 校舎 27 会場

SOFIX データベースに基づいた水田の特性解析
Analysis of the characteristics of paddy field based on SOFIX database
○馬場 崇誠、荒木 希和子、久保 幹（立命大生命）
○Takanobu BABA, Kiwako S. ARAKI, Motoki KUBO (Ritsumeikan Univ.)

【背景・目的】
水田は日本における主要な農地形態であり、現在でも耕作面積の 50%以上を占めている。イネの栽培期間中は基本的に湛水処理が行われることが畑とは異なる水田の大きな特徴である。湛水されると、水田土壌では窒素固定菌および嫌気性細菌の活性が高まる。したがって、水田には特異的な微生物環境が形成されており、土壌環境は水田と畑とでは大きく異なっている。土壌肥沃度指標（SOFIX : Soil Fertile Index）とは、土壌の物質循環に望ましい土壌成分の量とバランスを数値化する診断指標であり、土壌の成分、総細菌数、物質循環活性を測定することでその土壌の肥沃度を評価することができる。これまで、SOFIX に基づいて畑土壌を分析し、その分析結果をもとに畑の SOFIX データベースを構築してきた。畑のデータベースの解析から、畑の微生物環境と土壌成分量は密接に関係しており、C/N 比 10-25 程度で土壌細菌数や活性が向上することが明らかになっている。しかし、水田ではこのようなデータベースが構築されておらず、微生物環境と土壌成分量の関係が明らかになっていない。そこで、本研究では、水田のデータベース構築し、そのデータベースから水田の土壌成分および微生物環境の特性を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】
水田 100 か所から土壌を採取し、SOFIX 分析を行った。畑のデータベースと今回の分析結果の比較から、水田では総細菌数およびリン循環活性は高いが、窒素循環活性は低いことが明らかとなった。この結果から、水田環境は細菌にとって好適な環境であることが示唆される。しかし、イネは $NH_4^+$ を利用するため、土壌に残留する $NH_4^+$ 濃度が低くなり、窒素循環活性が低くなったと考えられる。また、総細菌数と TC の関係解析から TC と総細菌数には相関性がなかった。水田の総細菌数は 0～$40\times10^8$ cells/g の間に幅広く均一に分散しており、水田の TC は 10,000～20,000 mg/kg の間に多くのサンプルが集まっていた。これらの傾向は、畑の SOFIX データベースの傾向とは異なっていた。以上のことから、水田は確立された農法で管理されており、水田間での土壌成分量の違いは少ないことが明らかとなった。また、水田環境は細菌にとって好適な環境であり、潅水および限られた農薬の使用が微生物環境保全に寄与していることが示唆された。今後、水田土壌の検体数を増やすことで、より明確な水田の土壌成分量および微生物環境の関係が明らかになると期待される。

Organic material, Bacterial biomass, Paddy field

発表責任者：馬場　崇誠（sb0031hp@ed.ritsumei.ac.jp）

講演番号：4J27a11
講演日時：3 月 20 日 12:00～ J 校舎 27 会場

C4D 検出器の現場分析への応用
Application of C4D for on-site analysis
○長谷部 誉人[1]、植山 智紗[1]、吉野 将紀[2]、岡部 勝美[2]、安保 充[1] ([1]明治大・農、[2]明治大・黒川農場)
○Takato HASEBE[1], Chisa UEYAMA[1], Masaki YOSHINO[2], Katsuyoshi OKABE[2], Mitsuru ABO[1] ([1]Meiji Univ., [2]Meiji Univ., Kurokawa Farm)

【目的】
植物が栄養吸収を行なう水耕液や土壌中では、栽培植物の生育状態や施設栽培における塩類集積、露地栽培での降雨による栄養成分の溶脱などにより、イオン組成が常に理想の状態にあるとは限らない。イオン組成の変化をモニターし、補正すれば、より生産性を高められることが期待される。そこで、イオンクロマトグラフィーのような大型の装置ではなく、現場で結果が得られる分析系として、C4D (Capacitively coupled contactless conductivity detector: 非接触型電気伝導度検出器)の適用を着想した。具体的には、チップ型電気泳動装置と、持ち運び可能な CE (キャピラリー電気泳動)型の装置を検討した。
【方法および結果】
成分分析の中で、水耕液中の硝酸イオンは主要無機栄養素であると同時に、その排水が富栄養化に繋がる可能性があること、また土壌診断における追肥量の決定に重要な意味を持つことなどから、本法は無機陰イオン $NO_3^-$, $SO_4^{2-}$, $Cl^-$を分析対象とした。チップ型の装置として ChipGenie edition E (ASICON)を用いた。チップ（9.4 cm×1.6 cm）は PMMA 製のものを使用し、流路径は 0.100 mm、注入はピンチングインジェクションを用いて泳動距離が 7.1 cm のところを C4D (ET120, eDAQ)で検出した。分析で用いた泳動液は、田中らの報告[1)]を参考にヒスチジンとリンゴ酸を混合したものを用い、印加電圧-3.8 kV で分析を行った。その結果、試料注入の成功率が低く、またチップ上の有効長が短いため、少ない時間で分析が行えるものの、十分な分離が得られなかった。そのため、次に試料注入を落差法で行う CE-C4D の系を検討した。キャピラリーおよび電極のホルダーを特注し、電源は eDAQ 社製 ER430 を用い-3.0 kV を印加した。この装置は手動による落差法の原理で注入を行うため、注入誤差を内部標準で補正をした。また、フューズドシリカキャピラリー(GL Sciences、内径 50 μm, 外径 375 μm)を使用し、有効長を変化させて(15~21 cm : 全長 30 cm)至適条件を調べた。その結果 15 分以内に上記 3 つの陰イオンを分離度 1.5 以上で分析することが可能であった。今回はこの装置を用いた現場分析(明治大学黒川農場)の結果について報告する。
【参考文献】
1) Tanaka *et al., Chromatogr.,* 34, 2, 89-96 (2013).

C4D, Capacitively coupled contactless conductivity detector, On-site analysis

発表責任者：安保　充（abo@meiji.ac.jp）

講演番号：4J27a12
講演日時：3 月 20 日 12:15～ J 校舎 27 会場

液膜型硝酸イオンセンサーの開発と硝酸イオンのリアルタイムモニタリング
Development of nitrate ion-sensor and on-site monitoring of nitrate ion
○中尾 英策、白井 理、深尾 優子、北隅 優希、加納 健司（京大院農）
○Eisaku NAKAO, Osamu SHIRAI, Yuko FUKAO, Yuki KITAZUMI, Kenji KANO (Kyoto Univ.)

【目的】野菜の生育にはさまざまな元素が必要とされる。そのうち、窒素は収量に特に大きく関わり、アンモニウムイオンや硝酸イオン($NO_3^-$)を含む肥料が投与される。しかし、過度の施肥は生産物の品質を下げるおそれがあり、土壌からの流出による環境水の富栄養化をまねき、河川や海洋にまで悪影響を与える。したがって、土壌中の窒素を適切な濃度に制御しながら野菜を生育することが重要である。そのため、$NO_3^-$のモニタリングとそれに基づいた硝酸濃度の管理が必要となる。既存の $NO_3^-$の測定法として吸光光度法、伝導度測定法などが存在するが、試料の前処理を必要とし、また共存イオンの影響を受けるなどの課題が残る。本研究では、試料の前処理を必要とせず、長期間安定にモニタリングが可能となる液膜型イオン選択性電極(ISE)の開発を試み、その特性を評価した。
【方法】銀|塩化銀電極、$5.0\times10^{-5}$ M $MgCl_2$ および 0.05 M $Mg(NO_3)_2$ を含む内部溶液、$NO_3^-$感応膜で構成される ISE を構築した。$NO_3^-$感応膜として、tetradodecylammonium nitrate ($[TDDA^+][NO_3^-]$) および nitrophenyl octyl ether (NPOE) を含む polyvinyl chloride (PVC) 薄膜を用いた。外部参照電極(RE)としては、内部溶液に 0.05 M $MgCl_2$ および 1 M $MgSO_4$ を含む銀|塩化銀電極を用いた。なお、液絡部分には多孔質ガラス(バイコールガラス)を利用した。これらの RE と ISE は、まず既知濃度の $NO_3^-$溶液を測定し、検量線を作成したのちに長期間測定などの評価をおこなった。
【結果】感応膜中の NPOE と PVC の重量比が 2:1、$[TDDA^+][NO_3^-]$の含量を NPOE に対して 13 mg $mL^{-1}$ とした場合に最も安定した特性を持った電極が作成できた。この ISE を用いて $NO_3^-$の濃度に対する検量線を作成したところ、$NO_3^-$の濃度が $1.0\times10^{-4}$ ～$1.0\times10^{-1}$ M の範囲で傾きが約 45 mV $decade^{-1}$ の応答を示した。これは、試料溶液|感応膜間の界面電位差の変化で説明することができた。

また、ISE の応答に対する共存イオンによる妨害の有無を調べたところ、$SO_4^{2-}$、$CO_3^{2-}$、$HPO_4^{2-}$、$H_2PO_4^-$、$Na^+$では 0.1 M までは共存する場合でも影響は観察されなかったが、高濃度($1.0\times10^{-2}$ M 以上)の $Cl^-$および $K^+$が存在する場合は影響を受けることが分かった。

この $NO_3^-$センサーを用いて野菜の水耕栽培における養液中の $NO_3^-$濃度の長期間測定を行ったところ、植物の吸収による $NO_3^-$濃度の減少を確認することができた。今後、生育時期と硝酸吸収量の関係の解明や $NO_3^-$濃度を一定に制御するイオンスタットの構築にも取り組む予定である。

ion selective electrode, nitrate ion, on-site monitoring

発表責任者：中尾 英策（nakao.eisaku.72s@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4J28a01
講演日時：3 月 20 日 09:20～ J 校舎 28 会場

# 木質バイオマスからのベンゼン環を含まない新規有機蛍光物質の生産

# Production of novel organic fluorescents from lignin-derived aromatics in wood biomass

○岩淵 範之[1]、坂野 優[1]、砂入 道夫[1]、松藤 寛[2] ([1]日大・生資科・応生科、[2]日大・生資科・食生科)
○Noriyuki Iwabuchi[1], Yuki Sakano[1], Michio Sunairi[1], Hiroshi Matsufuji[2] ([1]Dept. Appl. Bio. Sci., Nihon Univ., [2]Dept. Food Biosci. Biotechnol., Nihon Univ.)

【目的】

リグニンは、未利用バイオマスのひとつであり、微生物機能を用いて高付加価値物質に変換する取り組みは、未利用バイオマスの有効利用という観点から非常に重要である。また、これらを利用する際には、カーボンニュートラルとしてのエネルギー利用ではなく、カーボンマイナスの概念を取り入れた「植物由来の炭素をなるべく $CO_2$ の形で排出せず、有用な次世代化成品に変換すること」が今後はより重要視されると考えられる。

当研究室では以前より、海洋の芳香族炭化水素分解菌について研究しており、その過程で東日本震災前後では、被災地沿岸の海水に存在する芳香族炭化水素分解微生物群集が極めて大きく変化していることを見出した。これらのことを踏まえ、被災地沿岸の海水の複合微生物系は、特に木質系バイオマスの難分解性分であるリグニン類に対して、有用な活性を有するのではないか？という仮説を立てた。本研究では、上記仮説に基づいたスクリーニングを行った結果、有機蛍光物質でありながら、その分子中にベンゼン環構造を含まない世界初の蛍光物質を生産する株 *Pseudomonas* sp. ITH-SA-1 株を取得したので、ここに報告する。

【結果と考察】

シリングアルデヒド(SYAL)などのリグニン由来の低分子芳香族化合物を基質として、水溶性の有機蛍光物質を生産する菌株を十数株取得した。一般に、有機蛍光物質は、優れた化学素材として利用価値が高いことから、中でも最も蛍光活性の高かった *Pseudomonas* sp. ITH-SA-1 株を用いて、以降の解析を行った。

各種培養解析、代謝産物解析などから、本蛍光物質は、励起/蛍光波長 365/498 nm のスペクトルを有する平均分子量が約 7.2 kDa の高分子であること、SYAL がシリンガ酸(SYAC)、3-O-メチルガリック酸(3-MGA)に変換後、重合により生成されることが明らかとなった。また、ATR-FTIR、NMR 解析の結果、本蛍光物質からはベンゼン環由来のシグナルが検出されなかったことから、本物質を、ベンゼン環構造を含まない有機蛍光物質(non-aromatic polymeric substances with fluorescent activities, NAPSFA)と名付けた(特開 2014-166143、ACS Sustainable Chem. Eng. 31(2):178-181, 2015)。NAPSFA は、従来の有機蛍光物質とは極めて異なる化学的性質を有しており、実際の木粉の酸化物からも生産できることから、今後の有効利用が期待される。

lignin-derived aromatics, Non-Aromatic Polymeric Substances with Fluorescent Activity, *Pseudomonas*

発表責任者：岩淵　範之（iwabuchi.noriyuki@nihon-u.ac.jp）

講演番号：4J28a02
講演日時：3 月 20 日 09:35～ J 校舎 28 会場

ベンゼン環を含まない新規有機蛍光物質の非バイオプロセスによる生産
Development of a Simple, Non-Biological Method for Converting Lignin-Derived Aromatics into Non-Aromatic Polymeric Substances with Fluorescent Activity
○坂野 優稀[1]、砂入 道夫[1]、松藤 寛[2]、岩淵 範之[1]([1]日大・生資科・応生科、[2]日大・生資科・食生科)
○Yuki SAKANO[1], Michio SUNAIRI[1], Hiroshi MATSUFUJI[2], Noriyuki IWABUCHI[1] ([1]Dept. Appl. Bio. Sci., Nihon Univ., [2]Dept. Food Biosci. Biotechnol., Nihon Univ.)

【目的】
リグニンは未利用バイオマスの一つであり、効果的な利用法の開発が望まれている。われわれは、バイオプロセスにより高付加価値物質へ変換する取り組みを行っており、これまでに、低分子リグニンの一種であるシリングアルデヒド(SYAL)を変換、重合し有機蛍光物質を生産する菌株、*Pseudomonas* sp. ITH-SA-1 株を東日本大震災の後の海水より単離している。本有機蛍光物質は、平均分子量が 7.2 kDa で Ex365 nm、Em498 nm の蛍光スペクトル示す物質であり、NMR 分析等からベンゼン環由来のシグナルが全く検出されないことが示されて、NAPSFA と名付けた(特開 2014-166143、ACS Sustainable Chem. Eng. 31(2):178-181, 2015)。一般に有機蛍光物質は剛直なπ電子共役系の供給源として分子内にベンゼン環を有しているが、上記結果は、本蛍光物質が希少な特徴を有していることを示唆している。また後続の研究により、SYAL の下流の代謝産物である 3-*O*-メチルガリック酸(3-MGA)と培地成分を反応させることにより蛍光物質が生産されることを見出した。この結果は、より単純化した系でも同様の蛍光物質が生産されることを意味していることから、本研究ではより詳細な検討を行った。
【結果と考察】
まず初めに、MB 培地、LB 培地、MM 培地を用いて、SYAL、シリンガ酸(SYAC)、3-MGA およびこれらのアナログ物質を基質として、ITH-SA-1 株による蛍光物質の生産を検討した。その結果、上述した 3 種類の化合物を添加した MB 培地、LB 培地において蛍光物質の生産が確認された。MM 培地では生産が確認されなかったことから、蛍光物質の生産には何らかの有機物が必要であることが示唆された。興味深いことに、3-MGA を基質とした場合、MB、LB 培地において ITH-SA-1 株無添加条件でも蛍光物質の生産が確認された。ここから 3-MGA 以降の代謝経路は、非バイオプロセスでも行われることが示唆された。後続の各種検討により、最も生産性の高い条件である 1%トリプトン溶液を用いて生産したサンプルの化学分析を行ったところ、Ex370 nm、Em505 nm 付近の蛍光スペクトルを有する平均分子量 4.2 kDa の蛍光物質が取得された。NMR、ATR-FTIR 解析の結果、本サンプルからはベンゼン環由来のシグナルは検出されなかったことから、NAPSFA が非バイオプロセスでも生産できることが示された(特願 2016-160123、ACS Sustainable Chem. Eng. 4(8):4411-4416, 2016)。また、本研究過程で多くの条件から蛍光スペクトルの異なる蛍光物質が生産されたことから、有機蛍光物質にはベンゼン環を含まない一群があることが示唆された。

lignin-derived aromatics, Non-aromatic polymeric substances with fluorescent activity, lignin utilization

発表責任者：岩淵 範之（iwabuchi.noriyuki@nihon-u.ac.jp）

講演番号：4J28a03
講演日時：3 月 20 日 09:50～ J 校舎 28 会場

タンパク質－パンクレアチン分解物と 3-MGA の反応により生成する有機蛍光物質について
Novel organic fluorescents produced from reaction of protein-pancreatic hydrolysates with 3-*O*-methylgallate
○廣川 侑美[1]、高野 浩樹[1]、関 華奈子[1]、坂野 優稀[2]、岩淵 範之[2]、大槻 崇[1]、松藤 寛[1]([1]日大生資科食生、[2]日大生資科応生)
○Yumi HIROKAWA[1], Hiroki TAKANO[1], Kanako SEKI[1], Yuki SAKANO[2], Noriyuki IWABUCHI[2], Takashi OHTSUKI[1], Hiroshi MATSUFUJI[1] ([1]Dept of Food Bioscience and Biotechnology, Nihon Univ., [2]Dept of Applied Biological Science, Nihon Univ.)

【目的】未利用たんぱく質の有効利用に関する研究は古くからよく行われており、機能性ペプチドへの変換・利用はその成功例として広く知られる。しかし、最終形態が「食品」であるため、様々な「制約」もある。我々は、リグニン及び低分子リグニンをバイオプロセスにより有機蛍光物質へ変換する取り組みを行っており、その中で、代謝物である 3-*O*-メチルガリック酸(3-MGA)と微生物培養時に窒素栄養源として培地に添加しているトリプトン（カゼイン酵素分解物）を振とうするだけで、微生物がいなくとも蛍光物質が生産されることを見出した。このことは、カゼインや食品たんぱく質を適切に処理することで、簡便に利用価値の高い蛍光物質へ変換できることを示唆しており、ごみとして捨てられている食品廃棄物を含めた未利用たんぱく質の有効利用化への発展が期待できる。そこで、本研究ではたんぱく質及びその分解物の蛍光物質への化学変換について検討した。
【方法及び結果】まず、カゼイン(α-, β-, κ-)、β-ラクトグロブリン、牛血清アルブミン、鶏卵アルブミン、大豆たんぱく質、脱脂ピーナッツたんぱく質と 3-MGA を反応させ、蛍光物質生成について検討した。結果、一部のたんぱく質では含有トリプトファンに由来すると考えられる弱い自家蛍光は認められるものの、3-MGA との反応による蛍光物質生成は認められなかった。カゼインの酵素分解物であるトリプトンとカゼインダイジェストは 3-MGA との反応により強い蛍光を示したが、ラクトアルブミン水解物やペプトンとの反応物の蛍光は弱く、またカゼイン分解物でも酸分解物では蛍光を示さなかった。20 種類のアミノ酸と 3-MGA との反応では、Arg と Lys の塩基性アミノ酸のみが異なる励起蛍光波長であったが、蛍光を示した。従って、3-MGA との反応において蛍光物質を生成するためには、アミノ基を 2 つ以上有するある特定配列の低分子ペプチドが必要ではないかと考えられた。Arg や Lys をトリプトンと同濃度で混合すると、蛍光強度は低下し、過剰なアミノ酸の存在は蛍光生成反応を抑制すると考えられた。次に、カゼインをペプシン、トリプシン、キモトリプシン、パンクレアチンで分解し、3-MGA と反応させた。市販トリプトン（カゼインのパンクレアチン分解物）には及ばなかったが、調製したカゼインパンクレアチン分解物が強い蛍光を示した。さらに、カゼイン以外のタンパク質を用いてパンクレアチン分解物を調製したところ、大豆・鶏卵・ピーナッツたんぱく質分解物はカゼイン分解物よりも強い蛍光を示した。一方、これらの分解物を HPLC にて分析したが、共通のピークは検出されず、3-MGA と反応して蛍光を発する物質は数多く存在すると考えられた。現在、分解物中の成分精製を試みているところである。

fluorescent substances, unutilized protein, food waste

講演番号：4J28a04
講演日時：3 月 20 日 10:05～ J 校舎 28 会場

アミンと 3-MGA の反応により生成する有機蛍光物質について
Novel organic fluorescents produced from reaction of amines with 3-O-methylgallate
○松藤 寛[1]、菅原 一真[1]、廣川 侑美[1]、坂野 優稀[2]、岩淵 範之[2]、大槻 崇[1]（[1]日大生資科食生、[2]日大生資科応生）
○Hiroshi MATSUFUJI[1], Kazuma SUGAWARA[1], Yumi HIROKAWA[1], Yuki SAKANO[2], Noriyuki IWABUCHI[2], Takashi OHTSUKI[1]（[1]Dept of Food Bioscience and Biotechnology, Nihon Univ., [2]Dept of Applied Biological Science, Nihon Univ.）

【目的】我々は、これまでの研究において、*Pseudomonas* sp. ITH-SA-1 株が、低分子リグニンであるシリングアルデヒド(SYAL)を出発物質として、これを変換・重合し、ベンゼン環構造を含まない新規な有機蛍光物質を生産することを見出した。また、SYAL の代謝物である 3-*O*-メチルガリック酸(3-MGA)と、培養の際に N 源として培地に加えているカゼイン分解物とを混合するだけでも同様の蛍光物質を生成することが判明した。分子量分画後の ATR-FTIR や NMR 測定からこれらの蛍光物質は構造中にベンゼン環構造を含まないことを明らかにしてきたが、これらの蛍光物質は数平均分子量が 4.2～7.2 kDa と大きく、また反応系が複雑な混合系であるため、詳細な構造決定には至っておらず、ベンゼン環構造を含まないのになぜ蛍光を示すのか、すなわち蛍光発光に必要なπ電子共役系と剛直な分子構造がどのように担保されているか不明である。そこで、本研究ではさまざまなアミン類と 3-MGA との反応性を調べ、蛍光物質の基本構造に関する知見を得ることを目的とした。
【方法及び結果】まず、炭素数鎖の異なるモノアミン類(C1-$NH_2$～C5-$NH_2$)とジアミン類($H_2N$-C2-$NH_2$～$H_2N$-C8-$NH_2$)及びエタノールアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミンを用い、温度(4, 20, 28℃)と反応日数(0～24 日)を変化させて、3-MGA と反応させた。結果、ジメチルアミンとトリメチルアミンを除くアミン類は、3-MGA と反応して蛍光を示した(励起波長 330-335 nm/蛍光波長 435-440 nm)。また、反応した多くのアミン類は低温よりも高温の方が、また反応日数の増加に伴い蛍光強度が増加した。炭素鎖の長さによる規則性は認められなかったが、エチルアミン(C2-$NH_2$)が他と比べて 2 倍ほど高い蛍光強度を示した。一方、エチレンジアミン($H_2N$-C2-$NH_2$)は反応直後に蛍光を示し、その後蛍光が減少したのに対し、エタノールアミン(HO-C2-$NH_2$)は 28℃のみが緩やかに反応するなど、官能基の違いは蛍光物質の生成速度に影響を及ぼすと考えられた。反応物を蛍光検出器を備えた逆相 HPLC に供したところ、十数の大小さまざまなピークが蛍光クロマトグラム上に観察された。アミノ酸との反応では、塩基性アミノ酸でのみ蛍光物質生成が確認されていたため、アミノ基を 2 つ以上有する化合物と開環した 3-MGA が共重合して蛍光物質を生成すると予想していたが、共重合しないモノアミン類との反応でも蛍光物質が生成したこと、またその反応生成物中に十数本の蛍光を有するピークが HPLC 上で観察されたことから、3-MGA との反応は複雑多岐にわたることが示唆された。現在、反応生成物を精製するため、UV 検出可能なベンジルアミンを用いて検討を行っている。

organic fluorescent, amine, 3-O-methylgallate

発表責任者：松藤　寛（hmatsufu@brs.nihon-u.ac.jp）

講演番号：4J28a05
講演日時：3 月 20 日 10:20～ J 校舎 28 会場

# イオン液体を反応場としたアルカリリグニンの分解と分解生成物の解析

Depolymerization of alkaline lignin in ionic liquids and analysis of the degradation products

○橘 弘一郎、阿部 英喜（理研 CSRS）
○Koichiro TACHIBANA, Hideki ABE (RIKEN CSRS)

【目的】　木質バイオマスであるリグニンは有望なバイオマス芳香族資源であるが、リグニンはフェノール骨格が多数の結合様式で連なる難溶性・難分解性ポリマーであるため、効率的な分解法の確立が必要である。一方で、いくつかのイオン液体がリグニンを溶解することが報告され[1,2]、イオン液体を反応場として利用することで効率的なリグニン分解の実現が期待できる。そこで本研究では、市販のアルカリリグニンを用い、各種イオン液体中での分解挙動を調べる事を目的とした。

【方法】　イオン液体は、イミダゾリウムカチオン（1-エチル-3-メチルイミダゾリウム=EMIM）および各種アニオンから成る非水系と、水酸化テトラブチルアンモニウム（TBAH）などの含水系の二種類を検討した。およそ 5 wt%のリグニン/イオン液体溶液を調製して試験に入れて密栓し、40 ℃、80 ℃、および 120 ℃にて一日熱処理を行った。反応後、溶液にアセトニトリルを添加して生じる沈殿ををろ別した。得られた沈殿は GPC 測定により分子量を算出し、可溶部は LC-MS および GC-MS を用いることで分解生成物の解析を行った。

【結果】各種イオン液体を用いて 40 ℃でのアルカリリグニン溶解性試験を行ったところ、非水系では極性の高い[EMIM][$CH_3COO$]や[SCN]がおよそ 5 wt%の溶解性を示した。これに対して、TBAH や TBPH などの含水系ではおよそ 30 wt%とより高い溶解性を示し、含水系の方が溶解性の点で優れることが分かった。続いて、これらのイオン液体を用いて分解試験を行い、可溶性の分解生成物を解析した結果、数種類の芳香族化合物が検出された。中でも、バニリンが主な生成物であり、イオン液体によって顕著な生成量の変化は見られなかった。しかし、含水系と比較して、非水系の[EMIM][SCN]などでは、分解生成物の種類が少なく、より選択的に分解生成物を得られる可能性が示唆された。一方で、分解温度が高温の場合、イオン液体の安定性によって挙動が異なり、分解生成物の組成変化および沈殿物の生成などが見られた。上記の知見から、高温でも安定であり、且つリグニン溶解性に優れる TBPH を用いた場合、最も高い収量でバニリンが得られた。

[1] A Mitsuru et al. *RSC Adv.* **2014**, 4, 17136.
[2] W. E. S Hart et al. *Green Chem.* **2015**, 17, 214-218.

Lignin, Ionic liquids, Biomass

講演番号：4J28a06
講演日時：3 月 20 日 10:35～ J 校舎 28 会場

# 木材腐朽菌の混合培養によるセルロース系原料からのエタノール生産

Ethanol production from cellulosic materials by mixed culture of fungus.

○井上 瑛絵、安藤 広将、堀沢 栄（高知工科大学）
○Akie INOUE, Hiromasa ANDO, Sakae HORISAWA (Kochi University of Technology)

食糧と競合しないセルロース系原料を用いたエタノール生産の場合は、脱リグニンや糖化の前処理工程が増えるため、製造コストが課題である。現在の前処理に用いられているは主に物理・化学的処理法は、処理速度が大きいものの、発酵阻害物質が生じる問題がある。阻害物質を生じない方法として、酵素や微生物を用いる方法も研究されている。我々は、セルロース系原料に含まれるリグニン及びセルロースを分解できる白色腐朽菌による前処理を検討してきた。さらに発酵性の菌株を用いることで、脱リグニン、糖化、発酵がひとつの反応器で処理できる、一貫バイオプロセス（Consolidated Bioprocessing (CBP)）が可能になると考えた。当研究室ではこれまでに、優れたエタノール発酵能をもつ スエヒロタケ（*Schizophyllum commune* NBRC4928）を見いだした 。この菌株は、グルコース、キシロース、セルロース、ヘミセルロースからエタノールを生成できることが明らかとなった。しかし、スギ材を原料として用いた場合、エタノールはほぼ生成されなかった。原因をリグニンの分解性の低さであると考え、リグニンの分解のために、リグニナーゼの１種である MnP の高生産菌であるヤケイロタケ（*Bjerkandera adusuta* IWA5b）との混合培養を行ったところ、エタノール生産量が増加した。本研究では、スエヒロタケとヤケイロタケの混合培養において、エタノールおよび MnP の生産量がともに高い条件を求めるために、MnP 生産性の向上のための通気条件、栄養添加条件を検討した。

リグニン分解を促進すれば、エタノールの生産が増加すると考え、MnP の生産が増加する酸素供給方法を検討した。酸素供給条件は、好気条件、好気条件から嫌気条件への切り替え、嫌気条件の３通りとした。MnP 生産量の増加を期待して培地にグルコースを添加したが、好気条件ではグルコースは MnP 生産に使われず、好気条件にも関わらずエタノールに変換された。その原因は、撹拌不足で部分的に嫌気条件となっていた可能性がある。また、酸素供給はヤケイロタケの MnP 生産量を増加させたが、生産されたエタノールはグルコースを原料として作られた可能性が高いため、MnP 生産量の増加はスギ材からのエタノール生産量の増加の原因ではないと考えられる。嫌気条件では、エタノール濃度は緩やかに増加し、その後ほとんど変化しなかった。嫌気条件では MnP がほとんど生産されなかったので、MnP はエタノール生産およびリグニン分解に貢献していないことが明らかとなった。従って、混合培養によってスギ原料からのエタノールが増加した理由は、MnP 以外のリグニナーゼによるリグニン除去または他の原因で増加したのではないかと考えられる。

Consolidated Bioprocessing, white rot fungi, cellulosic material

講演番号：4J28a07
講演日時：3 月 20 日 11:00～ J 校舎 28 会場

草本系バイオマス含有リグニン分解酵素産生微生物の新規マンガンペルオキシダーゼ
Newly-isolated manganese peroxidase(MnP) high-productivity microbe grown in cedan powclen as the sole canbont sourcp
○伊藤 龍[1]、山本 亮[2]、倉根 隆一郎[1,2] ([1]中部大学大学院、[2]中部大学)
○Ryu Ito[1], Ryo Yamamoto[2], Ryuitirou Kurane[1,2] ([1]Chubu University graduate school, [2]Chubu Univ)

**<目的 >**

二酸化炭素排出量削減のためのバイオエタノールが注目されている。第一世代バイオエタノールはトウモロコシなどの食糧デンプンを原料として生産されているため、食糧との競合が起こり、食糧問題や作物の価格上昇等深刻な問題も引き起こされている。そこで、非食部位である稲わらなどの草本系、木質系バイオマスのセルロースバイオマス資源等からの第二世代バイオエタノールの開発が期待されている。しかしながら、そのためには脱リグニンの工程が必要不可欠であり、現行の脱リグニン前処理工程ではアルカリ等処理が必要とされているが、これらの前処理工程より生じるリグニン含有排水処理問題が実用化への最大の壁となっている。そこで本研究では現行のアルカリ等前処理によらない生物的脱リグニン法をめざして、リグニン分解酵素であるマンガンペルオキシダーゼ等を強力に産生する新規微生物の探索を行った。
今回は取得した菌体が産生する酵素同定の為の精製、及び粗酵素を用いた複合酵素系による糖化について検討した。

**<方法>**

SDS-PAGE により分離したバンドからの切り出しにより精製を行った。
スギ粉末を基質として各種条件において複合酵素系により直接糖化を行い、DNS による還元糖量を測定した。

**<結果>**

リグニン分解酵素の精製、及び、複合酵素系による糖化について報告する。

lignin degradation, manganese peroxidase, wood-based biomass

講演番号：4J28a08
講演日時：3 月 20 日 11:15～ J 校舎 28 会場

エリアンサス茎葉の 4 ヶ月バンカーサイロ貯蔵／RT-CaCCO 処理が原料品質と酵素分解性に及ぼす影響

Effect of 4-month banker-silo storage/RT-CaCCO treatment on feedstock quality and enzyme digestibility of Erianthus stems and leaves

○池 正和[1]、趙 鋭[1]、服部 育男[2]、加藤 直樹[2]、上床 修弘[2]、我有 満[2,3]、徳安 健[1] ([1]農研機構・食研、[2]農研機構・九沖研、[3]農研機構・中央農研)

○Masakazu IKE[1], Rui ZHAO[1], Ikuo HATTORI[2], Naoki KATO[2], Naohiro UWATOKO[2], Mitsuru GAU[2,3], Ken TOKUYASU[1] ([1]NFRI, NARO, [2]KARC, NARO, [3]CARC, NARO)

【目的】我々は、地域農業・食品産業由来の繊維質資源の高度利用による産業活性化を目指した技術開発を行っている。これまでに、繊維質原料の前処理・糖化プロセスとして、水酸化カルシウム前処理物の中和に二酸化炭素を用いることを特徴とする CaCCO(Calcium Capturing by Carbonation)法を開発した [1)]。また、本法の高度化研究を進める中で、「室温、7 日間程度以上」での $Ca(OH)_2$ 処理で十分な前処理効果を得ることができることを明らかにし、RT-CaCCO 法として報告した [2,3)]。RT-CaCCO 法は「湿潤原料の安定貯蔵」と「繊維質前処理」同時に行うことができ、農作物未利用資源等の高度利用に繋がる有望な技術と考えている。本研究では、RT-CaCCO 法の圃場レベルでの検証を目的とし、エリアンサスの長期貯蔵時における原料組成変化や前処理効果について評価した。

【方法・結果】収穫直後のエリアンサス（ケンパーC2200, 設定切断長 5mm）をカッター付 TMR ミキサーに投入し、含水率 60%に加水調整後、$Ca(OH)_2$ を対乾物重量比 20%となるように添加・混合した。混合試料をバンカーサイロ（W250cm×D400cm×H90cm）に投入・鎮圧（投入原料約 3.5t、詰め込み密度 147kg-dryBM/$m^3$）後、密封し 138 日間貯蔵した。この際、バンカーサイロを 27（3×3×3）区画に分け、各区画の中心付近にバッグに入れた混合試料を配置して貯蔵を行った。貯蔵期間終了後、バッグ内試料を用いて成分解析、糖化特性等の評価を行った。尚、ラボスケールで同様の処理を行ったものを比較対象とした。貯蔵後の試料に関して、大部分の区画では pH12 程度であったのに対し、表面に位置する 4 つの区画において pH 低下が認められた（pH7～10 程度)。これらの試料においては、pH 低下が認められなかった試料と比較して、処理試料中のキシラン含有率や糖化後の糖回収率が低い傾向がみられた。一方、pH 低下が認められなかった区画試料については、ラボスケール処理物と同等の糖質成分組成及び糖化後の糖回収率が得られ、バンカーサイロ貯蔵においてもラボスケールと同等の前処理効果が確認できた。今回のバンカーサイロ貯蔵試験では、全体の 85%以上の原料について「湿潤原料の安定貯蔵」と「繊維質前処理」に成功したものと評価された。より処理収率を向上させるためには、バンカーサイロ貯蔵時における pH 低下防止措置が重要であると考えられる。

1) Park et al. Bioresour. Technol. 101, 6805-6811 (2010)
2) Shiroma et al. Bioresour. Technol.102, 2943-2949 (2011)
3) 池ら、応用糖質科学 3, 129-136 (2013)

Erianthus, CaCCO process, pretreatment

発表責任者：池正和（mikegogo@affrc.go.jp）

講演番号：4J28a09
講演日時：3 月 20 日 11:30～ J 校舎 28 会場

# 微粉砕・メタン発酵・高度膜分離による稲わらの利用

# Utilization of rice straw by a combinational process involving mechanical milling, methane fermentation and nanofiltration

○佐々木 建吾[1]、白井 智量[2]、柘植 陽太[3]、佐々木 大介[1]、菊地 淳[2]、近藤 昭彦[1] ([1]神戸大・科学技術イノベ、[2]理研・CSRS、[3]金沢大学)
○Kengo SASAKI[1], Tomokazu SHIRAI[2], Yota TSUGE[3], Daisuke SASAKI[1], Jun KIKUCHI[2], Akihiko KONDO[1] ([1]Kobe Univ., [2]RIKEN CSRS, [3]Kanazawa Univ.)

【背景と目的】リグノセルロース系バイオマスの利用が望まれており、稲わらは農産系資源の一つである。稲わらはセルロース・ヘミセルロース・リグニンから構成されており、生物化学的変換の前に処理が行われる。前処理の一つである微粉砕は極めて効果的であるが、エネルギー消費が大きいとされていた。しかし、ナノメックリアクターによる微粉砕は比較的に消費エネルギーが少ないとされており、稲わらの前処理に使用して効果を調べた。生物化学的変換としてメタン発酵を利用し、発酵を効率化するために微生物付着担体を充填した固定床式を用いた。さらに、発酵残渣液よりナノフィルトレーション法によりリグニンを回収する事で、稲わら成分の完全利用を目指した。
【結果と考察】稲わらに対して 10 サイクルの微粉砕によるエネルギー消費は 1.9 MJ/kg-稲わらに抑制されていた。微粉砕した稲わら 10 g/L を添加した培地を使用して水理学的滞留時間 5 日で固定床式メタン発酵槽を運転した。その結果、メタン生成量は 419 mL-$CH_4$/L/日に達し、微粉砕していない稲わらと比較して 193 mL-$CH_4$/L/日のメタン生成量の増加（約 85%上昇）が見込まれ、この増加エネルギー量は微粉砕によるエネルギー消費を越えていた。また、ナノフィルトレーション法により稲わらに含まれるリグニンの約 20%を回収していた。2 次元核磁気共鳴分析により、回収されたリグニンは芳香環であると考えられた。本研究は、文部科学省先端融合領域イノベーション創出拠点形成プログラム・バイオプロダクション次世代農工連携拠点の形成の支援を受けて実施した。

Mechanical milling, Methane fermentation, Nanofiltration

発表責任者：佐々木建吾（sikengo@people.kobe-u.ac.jp）

講演番号：4J28a10
講演日時：3 月 20 日 11:45～ J 校舎 28 会場

Characterization of Glutathione-Dependent Enzymes from White Rot Fungi
○WAN HASNIDAH WAN OSMAN[1,2], MENG I LIN[1,2], KEIKO KONDO[1], TAKASHI NAGATA[1,2], MASATO KATAHIRA[1,2] ([1]Inst. Adv. Energy, Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. Energy Sci., Kyoto Univ.)

Biomass refers to agricultural food and crops residues, wood residues, animal waste and organic municipal wastes. Wood is the main renewable material which composed by three major components; cellulose, hemicellulose and lignin. Lignin, the second abundant component becomes an important raw material for sustainable bio-refineries and also forerunner of high-value added products. However, lignin is undervalued and underdeveloped due to the complexity of its structure that contains abundant of beta-aryl ether linkage. Wood decaying fungi have developed a complex oxidative and hydrolytic enzyme and possess intracellular networks to deal with potential recalcitrant organic compound in wood degradation. Nevertheless, very few enzymes from fungi that involved in aromatic compounds metabolism have been characterized. Glutathione-dependent enzymes are the multifunctional enzymes that able to catalyze the in cellular detoxification reactions, could be one of the candidate that involved in aromatic compounds metabolism. Fungal glutathione-dependent enzymes also may have a role in cleavage of β-O-4 linkages. Sequence analysis was done and two glutathione-dependent enzymes of white rot fungi from Joint Genome Institute (JGI) database were selected for this study. The recombinant proteins were successfully produced in *Escherichia coli* and were purified using size exclusion chromatography after loading on an affinity column. In contrast with the other study, high yield of monomeric protein was obtained. The activity of these enzymes towards some prototypical substrates in the glutathionylation activity, as well as GSH-dependent peroxidase activity have been investigated. The activity assays were assessed spectrophotometrically using Plate Reader. The enzymes show different pattern of activity. Fluorogenic lignin model compound has been used in order to study the ability of these enzymes to degrade the lignin. Formation of the product was monitored continuously by using fluoro spectrophotometer. Based on the preliminary findings, one of the enzyme shows activity towards this compound. Taken together, these results indicate that these enzymes may plays important role in the detoxification as well as in lignin degradation. The on-going crystallization experiments also has been carried out to study the relationship between structure and activity.

glutathione-dependent enzymes, fungi, lignin

講演番号：4J28a11
講演日時：3 月 20 日 12:00～ J 校舎 28 会場

# Heterologous expression of the ligninolytic enzymes from wood rotting fungi and analysis of peroxidase activity, lignin model degradation, and homologous modeling

○MengI LIN[1,2], Keiko KONDO[1], Takashi NAGATA[1,2], Masato KATAHIRA[1,2] ([1]Inst. Adv. Energy, Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. Energy Sci., Kyoto Univ.)

Lignocellulose, or Wood biomass, which is composed of cellulose, hemicellulose, and lignin, is one of the most abundant and renewable material on earth. Among these components, lignin is a possible substituent of fossil resources for aromatic chemicals. However, because of its recalcitrant nature, lignin is generally extracted from wood through energy consuming and environmentally harmful treatments. To overcome these problems, ligninolytic peroxidases produced by white rot basidiomycetes may provide milder means to extract lignin.

The fungal ligninolytic enzymes are extracellular glycosylated class II heme peroxidase and often contain 4 to 5 pairs of disulfide bonds. To avoid incorrect folding and/or formation of inclusion body (IB), *Pichia pastoris* and *Aspergillus niger* have often been used as hosts for secretory recombinant protein expression. However, *P. pastoris* and *A. niger* systems are relatively time consuming compared with *E. coli* expression system. Here we have established the method to obtain soluble and active manganese peroxidases (MnPs) by heterologous expression in *E. coli* cytoplasm. Three MnPs registered in *Joint Genome Institute* database have been successfully expressed in a soluble form and their yield reached up to 30 mg/L-culture medium using 2-step purification. Heme incorporation to MnPs, which can be assessed by UV-Visible absorbance ratio of soret band to protein peak, is essential to obtain fully active ones. Our established method for MnP preparation stably gives the ratio higher than 3 (standard value $\geqq 3$), where even higher values (>5) can often be achieved.

The peroxidase activity of 3 recombinant MnPs were preliminary characterized by using DMP and ABTS as substrates under several different pH conditions. Surprisingly, one among three MnPs is found to catalyze ABTS even in the absence of manganese ion. However, it failed to oxidize non-phenolic veratryl alcohol despite its manganese-independent activity. These results may suggest that this particular MnP possesses novel enzymatic property as compared with other known fungal ligninolytic peroxidases. Structural differences of this MnP have also been analyzed by constructing homology models. The relation between structure diversity and function is under investigation. Additionally, oxidation of phenolic and non-phenolic lignin models has also been performed with recombinant MnP. The reactions were monitored and analyzed by NMR, GC-MS, and LC-MS. Interestingly, our latest results show that one, if not many, major repolymerized product, whose precise structure is under investigation, seems to be generated from phenolic lignin model.

wood biomass, white rot fungi, ligninolytic enzyme

講演番号：4J28a12
講演日時：3 月 20 日 12:15～ J 校舎 28 会場

# 各種前処理を施したサトウキビバガスのリグニン構造と酵素糖化効率の比較解析

# Comparative analysis of lignin structures and enzymatic saccharification efficiencies in pretreated sugarcane bagasse

○宮本 託志[1]、三橋 麻子[2]、山村 正臣[1]、飛松 裕基[1]、鈴木 史朗[1]、高田 理江[1]、小林 良則[2]、梅澤 俊明[1,3] ([1]京大生存研、[2]バイオインダストリー協会、[3]京大グローバル生存基盤)
○Takuji MIYAMOTO[1], Asako MIHASHI[2], Masaomi YAMAMURA[1], Yuki TOBIMATSU[1], Shiro SUZUKI[1], Rie TAKADA[1], Yoshinori KOBAYASHI[2], Toshiaki UMEZAWA[1,3] ([1]RISH, [2]JBA, [3]RUDGS)

【背景と目的】サトウキビは世界的に重要な糖料作物であり、優れた乾物生産を示すことからバイオマス作物としても注目されている。サトウキビからの糖生産の副生成物であるバガスは、セルロース、ヘミセルロースといった細胞壁多糖成分を豊富に含み、酵素糖化後、発酵原料として利用することができる。一方で、細胞壁の主要成分の一つであるリグニンが、酵素糖化の主要な阻害要因として働くことから、未処理バガスの糖化効率は著しく低い。そのため、酵素による糖化効率向上を目的とした前処理が施されることが一般的であるが、種々の前処理後における残存リグニンの構造と酵素糖化効率の関係については未だ不明な点が多い。本研究では、代表的な前処理であるアルカリ処理、水熱処理、希硫酸処理を施したバガスのリグニン構造を、各種化学分析及び 2D NMR 分析により詳細に解析し、糖化効率との関係を明らかにすることを目的とした。
【方法】バガス粉砕物にアルカリ処理（1% NaOH, 120 ℃, 20 min）、水熱処理（$H_2O$, 230 ℃, 10 min）、希硫酸処理（1% $H_2SO_4$, 170 ℃, 5 min）を施し、分析に供した。リグニン含量の定量にはチオグリコール酸法、リグニンの芳香核組成分析にはチオアシドリシス法を用いた。また 2D HSQC NMR 法により、リグニンの芳香核組成、モノマー間結合様式を詳細に解析した。糖化には、*A. aculeatus* 由来の BGL を *T. reesei* PC-3-7 株に導入して造成した糖化酵素 JN24H を用いた。
【結果と考察】リグニン含量はアルカリ処理バガスで最も低く、水熱処理バガス、希硫酸処理バガスは同程度に高い値を示した。アルカリ処理バガスのリグニンは、処理前と比べて、リグニン芳香核シリンギル（S）/グアイアシル（G）比が減少しており、S 核リグニンが優先的に除かれ、G 核リグニンが多く残存していることが示唆された。一方で、水熱処理バガスと希硫酸処理バガスのリグニンでは、化学分析及び HSQC NMR 分析から、酸縮合などの構造変化が起こっていることが示唆された。構造変化の程度は、希硫酸処理バガスと比べて、水熱処理バガスで大きいと推察された。酵素糖化効率は、アルカリ処理バガスで最も高い値を示し、アルカリ処理による脱リグニンが、サトウキビバガスの酵素糖化効率向上に効果的であることが示された。また、水熱処理バガスは、希硫酸処理バガスと比べて、酵素糖化効率が僅かに高い傾向にあり、リグニンの含量だけでなく、前処理後のリグニンの構造や存在形態（多糖の被覆状態など）が酵素糖化効率に影響を与えていることが示唆された。
【謝辞】本研究は、新エネルギー・産業技術開発機構（NEDO）の「バイオマスエネルギー技術開発/バイオ燃料製造の有用要素技術開発事業」の支援のもとに行った。

sugarcane, lignin, saccharification

発表責任者：梅澤俊明（tumezawa@rish.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4J29a01
講演日時：3 月 20 日 09:20～ J 校舎 29 会場

# マウス抗菌ペプチド cryptdin-4 の変異体を用いた作用機構の解析

# Mutation analysis of cryptdin-4, antimicrobial peptide from mouse

○平峰 里菜[1]、久米田 博之[1,2]、熊木 康裕[1]、菊川 峰志[1,2]、出村 誠[1,2]、中村 公則[1]、綾部 時芳[1]、相沢 智康[1,2] ([1]北大院先端生命、[2]北大 GI-CoRE ソフトマターGS)
○Rina HIRAMINE[1], Hiroyuki KUMETA[1,2], Yasuhiro KUMAKI[1], Takashi KIKUKAWA[1,2], Makoto DEMURA[1,2], Kiminori NAKAMURA[1], Tokiyoshi AYABE[1], Tomoyasu AIZAWA[1,2] ([1]Fac. Adv. Life Sci. Hokkaido Univ., [2]Soft Matter GS, GI-CoRE Hokkaido Univ.)

【背景と目的】

抗菌ペプチドは、生物が持つ自然免疫システムを担う重要な因子の 1 つであり、病原性微生物に特異的に結合し、主に膜構造の破壊によりそれらを殺す能力を有する。抗菌ペプチドは、耐性菌の出現や多量投与による腸内細菌叢のバランスの崩れが引き起こす様々な疾病が問題視されている抗生物質の代替候補としても注目を集めている。cryptdin-4(Crp4)は、モデル生物であるマウスの小腸で発見された抗菌ペプチドの一種であり、α-defensin に分類され、強い抗菌活性と幅広い抗菌スペクトルを持つが、腸内の共生細菌に対しては活性を持たないことがわかっている[1]。また、その構造は 3 本のジスルフィド結合を有し、親水性面と疎水性面からなる両親媒性である。この両親媒性構造が抗菌活性の発現に関係していると考えられるが、試料調製の困難さなどから、分子レベルでの殺菌メカニズムには未知の点が多く残されている。

そこで本研究では、Crp4 の両親媒性構造に変化を与える種々の変異を導入し、各変異体の活性への影響を検討することで、膜への作用機構を明らかにすることを目的としている。

【方法・結果】

Crp4 の親水性面又は疎水性面に位置する種々のアミノ酸をアルギニンに置換した変異体を計6種類(G9R, G14R, G22R, I23R, L26R, P30R)作製した。発現方法には、我々の研究室で検討してきた、封入体形成能の高いα-lactalbumin をパートナータンパク質とした共発現系を用いた[2]。この方法によりペプチドを封入体として発現させることで、宿主に対する毒性や宿主由来のプロテアーゼによる分解を回避できる利点がある。T7 プロモーターを用い、大腸菌株 BL21(DE3)を宿主として Crp4 との共発現を行った。得られた封入体を尿素で可溶化と同時にリフォールディングさせ、陽イオンクロマトグラフィーと逆相 HPLC で精製した。どの変異体も 5mg/L 以上の収量があった。NMR での解析を行い、すべての変異体が正しくフォールディングしていることを確認した。現在、変異体の活性測定中である。

[1] K. Masuda et al. (2011)/ *J Innate Immun* ,3(3),315-326.
[2] S. Tomisawa et al. (2015)/ *Protein Expr Purif*, 112, 21-28.

antimicrobial peptide, defensin, NMR

発表責任者：相沢智康（aizawa@sci.hokudai.ac.jp）

講演番号：4J29a02
講演日時：3 月 20 日 09:35～ J 校舎 29 会場

SUMO2 変異体ライブラリからの腫瘍壊死因子（TNF-α）親和性分子の選択
Selection of TNF-α-binding molecules from SUMO2 mutant libraries
○牧野 祥嗣、伊藤 春佳、河上 佳奈、磯貝 泰弘、伊藤 伸哉（富山県大工）
○Yoshihide MAKINO, Haruka ITO, Kana KAWAKAMI, Yasuhiro ISOGAI, Nobuya ITOH (Toyama Pref. Univ.)

【目的】レミケードなどの腫瘍壊死因子-α(TNF-α)に高親和な抗体医薬は、関節リウマチに対し劇的な治療効果を発揮する。しかし薬価が高く、患者および医療財政への負担となる。そこで、抗体ではないがその機能を代替可能な蛋白質を創出し、微生物を用いて安価に生産し利用する試みが進められている。本研究では、大腸菌を発現系として生産可能な、TNF-αへの結合活性を代替する非抗体タンパク質の創出を目指した。
【方法】まず、大腸菌での組換え発現が容易な small ubiquitin-like modifier 2 (SUMO2)タンパク質を骨格とした変異体遺伝子ライブラリを合成した。分子表面の 5 か所のアミノ酸にランダムなアミノ酸置換を導入するような、NNK コドン置換体（Lib1）、NNB コドン置換体（Lib2）の 2 種類の遺伝子を合成した。これらをファージミドベクターpdvec2 にクローニングし、ファージディスプレイライブラリを構築した。次に、TNF-αに親和性を有するタンパク質を選択、濃縮するため、磁性粒子を用いたバイオパニングを繰り返した。その後、ELISA 法および Biacore により TNF-α親和性の解析を行った。また、クローンのアミノ酸配列を解析した。
【結果】構築したライブラリサイズは Lib1 では $6.0\times10^7$、Lib2 では $4.0\times10^7$ であった。TNF-αに対するバイオパニングを行ったところ、TNF-α非固定磁性粒子よりも固定磁性粒子からのファージ回収率が高い傾向が見られた。6 回のパニング後、24 個のクローンをランダムに選択して解析したところ、Lib1 では 22 個、Lib2 では 14 個が同一のアミノ酸配列であった。パニング後に回収したファージライブラリを ELISA 法により解析したところ、TNF-α固定および非固定で有意な差は見られなかった。しかし、パニング後のライブラリからクローンを単離し単独発現させ、Biacore を用いて TNF-αとの親和性を解析したところ、弱いながら有意なシグナルが観察された。このことから、このクローンの TNF-αに対する親和性が示唆された。

small ubiquitin-related modifier 2, tumor necrosis factor α, phage display library

発表責任者：牧野祥嗣（makino@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：4J29a03
講演日時：3 月 20 日 09:50～ J 校舎 29 会場

GABA 受容体ρ3 サブユニット細胞外領域の集合状態
Aggregation state of GABA receptor rho3 subunit extracellular domain
○安杖 圭介、小栗栖 太郎 (岩手大学)
○Keisuke Anzue, Tarou Ogurusu (Iwate Univ.)

チャンネル連結型受容体は化学シナプスにおける情報伝達の鍵となるタンパク質であり農薬等の有用な薬剤の作用点である。いくつかの受容体の立体構造が解明されており、４つの膜貫通領域を含むサブユニットが５つ集合して１つの受容体を構成していることが確認されている。我々はラット GABA 受容体 ρ3 サブユニットを発見し、発現部位や電気生理的性質を解明した。このサブユニットのホモオリゴマーにより塩素イオンチャンネル活性のある受容体を構成できることを示した。本研究では、GABA 結合部位を含み水溶性と予想される N 端側の細胞外領域の集合状態を解析した。

ベクターpMAL-c2 (NEB)を利用し、マルトース結合タンパク質 (MBP) の C 端に ρ3 サブユニットの 22 から 264 番残基の領域を結合した融合タンパク質を大腸菌に発現させた。アミロースカラムにより融合タンパク質を精製し、FactorXa により MBP を切除した。NaCl が 1 M 以上の濃度、pH 8.0 で酸化し、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより FactorXa と MBP を分離した。得られた標品に細胞外領域が含まれることは、SDS-PAGE 染色バンドのゲル内トリプシン消化物の MALDI-TOF MASS により確認した。

0.1 M NaCl, 10 mM Hepes (pH 7.4), 1mM EDTA, 0.1% Tween-20, ±GABA(10 mM)存在下にゲルろ過クロマトグラフィーを行い、各フラクションに含まれる細胞外領域を SDS-PAGE の蛍光染色バンドの蛍光量から見積もった。大部分が高分子の領域で溶出し、細胞外領域が凝集していることが示唆された。溶出液に GABA が存在する場合には単量体に相当する領域でも溶出が観察された。残念ながら、単量体の検出量は実験毎にばらつき、種々の条件を検討したが安定な結果を得ることが困難であった。2 M NaCl, 20% sucrose 存在下に生じる沈殿物と上清をゲルろ過クロマトグラフィーにより分析したところ、上清からは単量体を検出できなかったが、沈殿物から単量体を検出することができた。単量体の量は時間とともに減少し、凝集状態へ移行することが示唆された。

以上の結果は、GABA 受容体 ρ3 サブユニットの細胞外領域は凝集しやすい状態にあるが、GABA が存在すると凝集状態が一部解除され、単量体が形成されることを示唆する。GABA に依存した単量体の存在は GABA による受容体のチャンネル開口機構との関連で興味深い。

GABA, receptor, rho3 subunit

講演番号：4J29a04
講演日時：3 月 20 日 10:05～ J 校舎 29 会場

# ジャガイモ由来抗菌ペプチド snakin-1 の発現系構築

# Expression, purification and characterization of the recombinant cysteine-rich antimicrobial peptide snakin-1 derived from potato

○山野 めぐみ[1]、クドゥス モハマド ルフール[1]、ルミ ファルハナ[1]、堤 元佐[1]、久米田 博之[2,3]、熊木 智康[4]、神谷 昌克[2]、菊川 峰志[1,2,3]、出村 誠[1,2,3]、相沢 智康[1,2,3]（[1]北大院生命、[2]北大院先端生命、[3]北大 GI-CoRE ソフトマターGS、[4]北大院理）
○ Megumi Yamano[1], MD Ruhul Kuddus[1], Farhana Rumi[1], Motosuke Tsutsumi[1], Makoto Demura[2,3], Yasuhiro Kumaki[4], Masakatsu Kamiya[2], Takashi Kikukawa[1,2,3], Makoto Demura[1,2,3], Tomoyasu Aizawa[1,2,3] ([1]Grad. Sch. Life Sci. Hokkaido Univ., [2]Fac. Adv. Life Sci. Hokkaido Univ., [3]Soft Matter GS, GI-CoRE Hokkaido Univ., [4]Fac. Sci. Hokkaido Univ.)

**【背景】** 抗菌ペプチド snakin-1（SN1）はジャガイモの塊茎に存在し、植物に対して病原性を有する糸状菌等に対して活性を持つ。63 アミノ酸残基から構成され(Mw. 6922 Da, pI=8.97)、20%の高い割合でシステインが含まれているため 6 本ものジスルフィド結合が形成され複雑な三次構造を有している。相同性の高いペプチドが植物に広く存在することが報告されているが、抗菌活性発現の作用機序等はいまだ解明されていない。

抗菌ペプチドの遺伝子組換え調製においては、目的ペプチドを封入体として発現させることでプロテアーゼの分解、宿主細胞への毒性を防ぐ手法が広く知られているが、SN1 については大腸菌宿主内での封入体の形成が不安定で試料調製が困難であった。そこで以下 2 つの新たな発現系の構築を目指した。一つ目は大腸菌宿主内で封入体形成能の高いパートナータンパク質との共発現により封入体化を促進する手法[1, 2]、二つ目は酵母 *Pichia pastoris* を宿主としてメタノール代謝に関連する強力なプロモーターを使用し、分泌発現を行う方法である。

**【方法・結果】** T7プロモーターを用いて大腸菌株 BL21(DE3)を宿主とした共発現系では、パートナータンパク質としてヒトα-ラクトアルブミンを選択し、SN1 との共発現を行うことで、単独での発現と比較して封入体形成量の向上が確認された。得られた封入体を回収し、変性可溶化、透析により巻き戻しした後、逆相 HPLC で精製した。

*P. pastoris* を用いた分泌生産型では、高密度培養を行った培養上清からイオン交換クロマトグラフィー及び逆相 HPLC により直接 SN1 を精製することでができた[3]。これら 2 つの手法は従来と比較して収量増加へ効果的であることが確認され、得られた SN1 は天然由来のものと同等の抗菌活性を保持しており、MS、CD、NMR スペクトルの比較から正しいジスルフィド結合パターンを有していることが示唆された。また、発現系を利用することで、安定同位体標識試料の調製にも成功し、良好な NMR スペクトルを得ることにも成功した。

[1] S. Tomisawa *et al*., ***AMB Express***., **3**, 45 (2013)
[2] S. Tomisawa *et al*., ***Protein Expr. Purif***., **112**, 21 (2015)
[3] MR. Kuddus *et al*., ***Protein Expr. Purif***., **122**, 15-22 (2016)

snakin-1, antimicrobial peptide, overexpression

発表責任者：相沢智康（aizawa@sci.hokudai.ac.jp）

講演番号：4J29a05
講演日時：3 月 20 日 10:20～ J 校舎 29 会場

# 哺乳動物細胞におけるポリシアル酸転移酵素の活性発現制御機構の解析

# Analysis of the regulatory mechanism of expression levels of mRNA and protein for polysialyltransferases

○石原 幸奈[1,2]、羽根 正弥[1,2]、北島 健[1,2]、佐藤 ちひろ[1,2]（[1]名大院・生命農学、[2]名大・生物機能開発利用研究セ）
○Yukina ISHIHARA[1,2], Masaya HANE[1,2], Ken KITAJIMA[1,2], Chihiro SATO[1,2]（[1]Grad. Sch. Bioagr. Sci. Nagoya Univ., [2]Biosci. Biotech. Center, Nagoya Univ.）

＜背景と目的＞
ポリシアル酸（polySia）は、酸性九炭糖であるシアル酸がα2,8 結合で 8-400 残基結合した直鎖状ポリマーであり、神経細胞接着分子（NCAM）を修飾する。ポリシアル酸は、胎児脳で一過的に、成体脳では神経の再構築が盛んな一部の領域に存在している。その機能としてポリシアル酸構造の大きな負電荷とその立体障害により細胞間相互作用を負に制御する反接着作用が知られている。また当研究室では、ポリシアル酸が神経生理活性因子と直接結合してその分子を保持し、その細胞外濃度を調節するリザーバー機能やプロテアーゼ保護活性を見出してきた。これらの多様なポリシアル酸の性質により正常な神経回路形成や神経発達が調節されていると考えられている。ポリシアル酸を NCAM 上に時・空間特異的に生合成するポリシアル酸転移酵素（polySTs）として STX と PST が知られている。これらの酵素は、発達段階に従い異なる発現パターンを示し、どちらも単独でポリシアル酸の伸長が可能だが、共存する場合には協調的に作用することが知られている。本研究では、この polySTs に着目して、酵素の発現の制御メカニズムおよび酵素/基質間の相互作用を明らかにすることを目的とした。
＜結果と考察＞
各種ヒト由来培養細胞（HEK293 細胞、SK-N-SH 細胞、HeLa 細胞）を用いて、STX および PST 酵素の遺伝子発現を real-time PCR を行い定量した。その結果、STX が mRNA レベルで明確に検出された細胞株において、ポリシアル酸の発現が確認されたのは SK-N-SH 細胞のみであった。このことから、polySTs 遺伝子の発現があるにもかかわらずその反応産物が検出されない細胞株があることがわかった。従ってこれらの細胞では、酵素と基質の両者の発現があっても、ポリシアリル化に至らず、酵素が通常の活性を発揮できない状態にあることが示唆された。
また、NCAM を内在的に発現し、polyST を発現していないマウス神経芽細胞に対して酵素遺伝子を導入し、単独発現系と共発現系における酵素の発現とポリシアル酸の発現を解析した。mRNA の発現量は real-time PCR、タンパク質の発現量はウェスタンブロッティングを行うことで定量した。その結果、mRNA の発現パターンとタンパク質の発現パターンが変化していること、PST のタンパク質の発現量が STX に対して低く制御されていることが明らかになった。このことは、細胞内において酵素の発現が相互に影響を与える可能性を示しており、新たな酵素発現制御機構の存在が示唆される。

polysialic acid, polysialyltransferase, neural cell adhesion molecule

講演番号：4J29a06
講演日時：3 月 20 日 10:35～ J 校舎 29 会場

肝細胞における N-結合型糖鎖と B 型肝炎ウイルス感染効率の関係性解明
Elucidation of the relationship between Hepatitis B Virus (HBV) infection efficiency and N-Glycans of hepatocellular cells

○中谷 漱志[1]、三﨑 亮[1]、岡本 徹[2]、PRIYAMBADA Surya Agung[2]、大橋 貴生[1]、松浦 善治[2]、藤山 和仁[1] ([1]大阪大学　生物工学国際交流センター　応用微生物学研究室、[2]大阪大学　微生物病研究所　分子ウイルス分野)
○Soshi NAKAYA[1], Ryo MISAKI[1], Toru OKAMOTO[2], Surya Agung PRIYAMBADA[2], Takao OHASHI[1], Yoshiharu MATSUURA[2], Kazuhito FUJIYAMA[1] ([1]Applied Microbiology Laboratory, International Center for Biotechnology, Osaka Univ., [2]Department of molecular virology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka Univ.)

［研究背景］
今日における主要な病気の一つにウイルスによる感染症が挙げられる。しかしながら、本研究で着目した B 型肝炎ウイルス(HBV)をはじめ、多くのウイルスでは分子レベルでの構造や感染の各ステップにおける分子機構が明らかになっていない。B 型肝炎は、慢性化すると高確率で肝硬変や肝臓ガンといった命に関わる合併症を引き起こすが、現存の治療薬での完治は困難であるため、新しい B 型肝炎治療薬の早急な開発が求められている。
近年の研究でウイルス表面タンパク質あるいは宿主細胞の *N*-結合型糖鎖がウイルス感染に深く関わっているという報告がある。HBV 表面抗原(HBsAg)も他のウイルス表面タンパク質同様に *N*-結合型糖鎖を保持しているが、HBsAg 由来あるいは、宿主由来の *N*-結合型糖鎖が HBV 感染にどのように関与しているのかは明らかになっていない。HBV 感染の各ステップにおける *N*-結合型糖鎖の分子機能を解明できれば、これらを特異的にブロックする糖転移酵素阻害剤を開発することができ、画期的な抗 HBV 薬開発の糸口となりうる。
以上のことを踏まえ、本研究では HBV の感染と、宿主細胞の *N*-結合型糖鎖の関係解明を目的とした。
［実験方法及び結果］
Sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP)を高発現するヒト肝ガン細胞 HepG2-hNTCP-C4 に HBV を感染させ、HBV 感染による細胞内の糖鎖修飾関連酵素遺伝子発現量の変化を qRT-PCR にて解析した。HBV 感染細胞では、非感染細胞と比較して特にα-2,3-シアル酸転移酵素およびα-2,6-シアル酸転移酵素の発現量が顕著に増加した。さらに、シアル酸転移酵素の阻害剤を培地に添加し、同細胞株に HBV を感染させたところ、感染細胞内の HBV 遺伝子発現量が増加することが分かった。
［結論］
本研究より、HBV の感染が、宿主細胞の *N*-結合型糖鎖のうちシアル酸型糖鎖量の増加をもたらすことが示唆された。また、宿主細胞のシアル酸型糖鎖量の変化が、HBV の感染あるいは増殖効率に影響することが示された。上記の結果より、HBV 感染に宿主細胞のシアル酸型糖鎖が重要な役割を果たすことが分かった。

HBV, N-glycosylation, sialylation

講演番号：4J29a07
講演日時：3 月 20 日 11:00～ J 校舎 29 会場

# カベオリン-1 の化学合成研究及び細胞膜内ドメインの構造解析

# Study for chemical synthesis of caveolin-1 and structural analysis of intramembrane domain

○藤本 梨菜、武居 俊樹、朝比奈 雄也、佐藤 毅、北條 裕信 (阪大蛋白研)
○RINA FUJIMOTO, TOSHIKI TAKEI, YUYA ASAHINA, TAKESHI SATO, HIRONOBU HOJO (Inst. Protein Res., Osaka Univ.)

カベオラとは、細胞膜に存在する微小な窪み構造を指し、細胞シグナル伝達、エンドサイトーシスなどの機能を担う膜マイクロドメインである(Fig.1)。細胞質側に窪んだその構造は、とりわけ膜タンパク質であるカベオリン-1(cav-1)の寄与が大きい。Cav-1 にはアセチル化・リン酸化・パルミトイル化が施されている。近年の報告より、Cav-1 がシグナル伝達を厳密に調節していること、カベオラエンドサイトーシスは、カベオリン-1 の存在が不可欠であることが示唆されている。これら機能の発現は、cav-1 の翻訳後修飾が密接に関与すると推測されている。しかし、膜タンパク質の高い疎水性により精製効率が低いことに加え､均一な翻訳後修飾を有した cav-1 の発現自体も困難であるため、翻訳後修飾と機能の相関関係についてほとんど明らかとされていない。そこで、本研究では化学合成法を駆使し、cav-1 の全合成に取り組むこととした。全長 177 残基を５つのセグメントに分割し、各セグメントを固相法により調製した。特に疎水性領域にはイソペプチド法[1)]を適用し、可溶化を試みた。セグメントの調製を終え次第、ペプチド縮合法により全長ポリペプチド鎖の合成を行う予定である。

また、我々は cav-1 の構造解析も並行して行った。シミュレーションによって cav-1 の構造モデルは提唱されているものの[2)]、脂質膜上で構造を解かれた報告例はない。我々は全体の立体構造を明らかにすることを目指して、まずは細胞膜内ドメイン(99-127)の構造解析から着手することとした。そこで、対応する一次配列を固相法により得た後、脂質膜上における cav-1 の膜結合性及び二次構造を蛍光分光光度法及び CD スペクトル測定を用いて観察した。その結果、脂質存在下では部分配列内の $Trp^{115}$ 残基は疎水性環境下へ移行し､細胞膜内ドメインがα-ヘリックス構造を形成することが確かめられた。

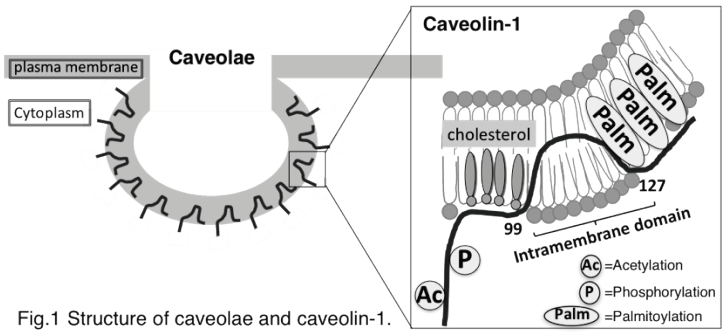


Fig.1 Structure of caveolae and caveolin-1.

参考文献

1) Sohma, Y., Sasaki, M., Hayashi, Y., Kimura, T. and Kiso, Y., *Chem. Commun.*, 124-125, (2004)
2) Parton, R. G., Hanzal-Bayer, M. and Hancock, J. F., *J. Cell Sci*, **119**, 787-796, (2005)

caveolin-1, thioester method, membrane protein

講演番号：4J29a08
講演日時：3 月 20 日 11:15～ J 校舎 29 会場

セロビオース構造を含む分岐オリゴ糖の酵素合成とその腸内細菌叢へ与える影響
Enzymatic synthesis of branched maltooligosaccharides with cellobiosyl unit and its effect for Enteromicroflora
○志村 洋一郎、石山 美穂、加藤 朋子、田村 佳奈、水野 善則、安達 隆史、阿部 友美、福島 淳、稲元 民夫（秋田県大生資）
○Yoichiro SHIMURA, Miho ISHIYAMA, Tomoko KATO, Kana TAMURA, Yoshinori MIZUMO, Takashi ADACHI, Tomomi ABE, Jun FUKUSHIMA, Tamio INAMOTO (Akita Pref. Univ.)

＜背景・目的＞
腸内有用菌の維持にプロバイオティクスやプレバイオティクスの利用がある。これまでに、分岐オリゴ糖に着目し、新規構造を持つ非還元性分岐オリゴ糖を酵素的に合成した（Shimura ら、2011）。今回は、セロビオース構造を含む分岐オリゴ糖（セロビオ分岐オリゴ糖）を酵素的に合成し、モデル腸内細菌叢への添加効果を検討した。
＜方法＞
好熱性放線菌 *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 からクローニングされたプルラン分解性アミラーゼ（TVA II）の糖転移反応を利用し、5%プルランと 5%セロビオースを反応液としてセロビオ分岐オリゴ糖を合成した。分岐オリゴ糖は Mightysil RP18 GP Aqua カラム（関東化学）を用いた HPLC により、水を移動相として分離精製した。モデル腸内細菌叢として SPF 鶏盲腸内容培養物を使用し、3 種のセロビオ分岐オリゴ糖混合液を終濃度 1%となるように添加培養し、24 時間毎に採取しながら 72 時間まで嫌気培養した。細菌叢は、採取した培養液から全 DNA を精製し 16S rRNA 遺伝子の部分配列を PCR-DGGE 法にて解析した。
＜結果・考察＞
酵素的糖転移反応で 3 種のセロビオ分岐オリゴ糖が生成することが HPLC により確認された。精製された分岐オリゴ糖の $^{1}$H NMR により $\beta$ 結合のシグナルを観測し、セロビオース構造を含む事が確認された。またそれぞれの MS 分析により、*m/z* 827 $[M-H]^-$ が観測された事から、パノシル基にセロビオースが $\alpha$1,4 あるいは $\alpha$1,6 結合した 5 糖である事が確認できた。3 種のセロビオ分岐オリゴ糖混合物を添加培養した SPF 鶏盲腸内容培養物の菌叢の変化を調べた所、無添加のもの、構成するパノースあるいはセロビオースのみを添加したものと比較し、48 時間目のサンプルで *Lactobacillus* 属の特異的なバンドが強化されたことから、セロビオ分岐オリゴ糖が選択的に利用されることが明らかとなった。3 種のセロビオ分岐オリゴ糖のどの成分が、選択的に資化されるのかを今後検討する予定である。

branched oligosaccharides, cellobiose, Lactobacillus

発表責任者：志村洋一郎（yshimura@akita-pu.ac.jp）

講演番号：4J29a09
講演日時：3 月 20 日 11:30～ J 校舎 29 会場

# 単一チャネル電流の解析によるグラミシジン A チャネルのイオン透過機構の解明

# Elucidation on the Transport Mechanism of Gramicidin A Channel Based on the Analysis of Single Channel Currents

○白井 理、山口 拓也、北隅 優希、加納 健司（京大院農）
○Osamu Shirai, Takuya Yamaguchi, Yuki Kitazumi, Kenji Kano (Kyoto Univ.)

【緒言】イオンチャネルは一般的に透過選択性を有し、透過イオンの細胞内外の電気化学ポテンシャル差に応じて、そのイオンを輸送する。細胞は閉じた系となっており、細胞内外では電気的中性則を満たしながら物質輸送が行われている。したがって、イオンチャネルによるイオン透過においても、他の共存イオン、とくに対イオンが大きな影響を与えると考えられる。

本研究ではカチオン選択性チャネルとしてよく知られているグラミシジン A (gA) チャネルを用いて、対イオンの種類を替えた際の単一チャネル電流の詳細な解析を行い、イオン透過選択性の発現機構についても議論する。

【実験】厚さ 0.1 mm のテフロンシートの中央に直径 0.4 mm の小孔をあけ、それを介して 2 室を有するガラス製セルを構築した。セルの 2 室 (W1 および W2) を電解質溶液で満たし、10 mg $mL^{-1}$ の phosphatidylcholine および 2.5 mg $mL^{-1}$ の cholesterol を含む *n*-decane 溶液を小孔に塗りつける刷毛塗法によって平面脂質二分子膜(pBLM)を作製した。電解質としては KCl、CsCl および CsBr を用いた。W1 および W2 に gA の終濃度が $10^{-16}$ M となるように gA のエタノール溶液を添加し、pBLM へ自発的に分配させることで gA チャネルを形成させた。pBLM を介した 2 水相間に電位差(–120 mV~120 mV)を印加し、その際に流れるイオン透過電流を測定した。統計処理により単一チャネル電流を評価し、その印加膜電位および電解質濃度に対する依存特性について検討を行った。さらに、2 水相の電解質濃度が異なる濃度非対称系でも測定を行い、カチオン及びアニオンの膜内拡散係数比を評価した。

【結果】何れの電解質を用いた場合も、W1 および W2 の電解質濃度が等しい濃度対称系では、単一チャネル電流は印加膜電位に比例した。測定した電位領域では常に直線的な電位依存特性が成立していたので、膜相における物質輸送過程が律速段階であることが判明した。一方、濃度依存特性は、電解質濃度が低濃度の場合は直線関係が成り立ったが、高濃度になると電流値が頭打ちとなった。単一チャネル電流の電解質濃度依存特性は膜相 (チャネル部位) の電解質濃度を反映しており、電流値の頭打ちは、膜相の電解質濃度が上限に達していることを意味している。電解質として CsCl を用いた場合の結果と CsBr を用いた場合の結果を比較すると、膜相における電解質濃度の上限はアニオンの種類に依らないことが示唆された。また、濃度非対称系では、カチオンとアニオンの膜内拡散係数が異なるために単一チャネル電流は膜電位に対して非線形な応答を示した。なお、アニオンとカチオンの輸送に分けて解析した結果、$Cs^+$、$K^+$、$Cl^-$の膜内拡散係数の比は 6:2:1 であった。

gramicidin A, channel transport, electrochemical

発表責任者：白井　理（shiraio@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4J29a10
講演日時：3 月 20 日 11:45～ J 校舎 29 会場

# 全アミノ酸スキャニング変異導入法と無細胞タンパク質合成系を用いた耐熱化 MMLV 逆転写酵素スクリーニング系の構築

# Establishment of the screening system for thermostable Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase using a site saturation mutagenesis and a cell-free protein expression system

○李 瞳陽[1]、片野 裕太[2]、中村 実世[1]、馬場 美聡[2]、伊東 昌章[3]、滝田 禎亮[1,2]、保川 清[1,2]([1]京大農、[2]京大院農、[3]沖縄高専)
○Tongyang Li[1], Yuta Katano[2], Miyo Nakamura[1], Misato Baba[2], Masaaki Ito[3], Teisuke Takita[1,2], Kiyoshi Yasukawa[1,2] ([1]Faculty of Agric., Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [3]National Institute of Technology, Okinawa College)

【目的】逆転写酵素（RT）は分子生物学的研究や臨床診断において必要不可欠な酵素である。今日、モロニーマウス白血病ウイルス(MMLV)RT が使用されているが、RNA の二次構造をなくし、反応効率を向上させるために耐熱化が求められている。我々は部位特異的変異により、耐熱性が向上した MMLV RT である MM4（E286R/E302K/L435R/D524A）を作製した[1)]。しかし、その耐熱性は PCR に使用されている耐熱型 DNA ポリメラーゼと比較すると著しく低い。近年、我々は無細胞タンパク質合成系により MMLV RT を発現させ、その性状が大腸菌で発現させたものと同等であることを報告した[2)]。本研究では、新たな耐熱型 MMLV RT を得るために、全アミノ酸スキャニング変異導入法と無細胞タンパク質合成系を用いたスクリーニング系の構築を試みた。
【方法】1. 全アミノ酸スキャニング変異導入法によるライブラリーの作製：C 末端に$(His)_6$が結合した MMLV RT（Thr24−Leu671）をコードする遺伝子が pET22b(+)の NdeI サイトと EcoRI サイトに挿入された発現プラスミドを鋳型として、QuikChange HT Protein Engineering System（アジレントテクノロジー）により、Ala70 から Arg469 までの 400 アミノ酸残基の各々のアミノ酸残基のコドンを他の 19 種類のアミノ酸残基のコドンに置換した。これを大腸菌 BL21(DE3)に導入した。2. MMLV RT の発現：個々の形質転換菌を 96 穴プレートで培養後、培養液を 8 クローン分ずつ混合し、それぞれからプラスミドを抽出した。このプラスミドから無細胞タンパク質合成キット（ジーンフロンティア）により、MMLV RT を発現させた。3. 耐熱性の評価：無細胞タンパク質合成の反応液を一定温度（51～63℃）で 3 分間熱処理後、モデル RNA を用いた RT-PCR（cDNA 合成反応の温度は 45℃）を行った。
【結果】1. ライブラリーの作製：任意の 95 クローンの塩基配列を解析した結果、34 クローン（36%）で目的の変異が確認された。2. 耐熱性の評価：本無細胞タンパク質合成系で発現させた野生型 MMLV RT（WT）の活性が見られた最大温度は 53℃であったが、MM4 では 62℃であった。
【考察】これらの結果より、本スクリーニング系が十分機能すると考えられた。現在、耐熱化 MMLVRT のスクリーニングを行っている。
【文献】1. K. Yasukawa *et al.* (2010) *J. Biotechnol.* **150**, 299−306
2. Y. Katano *et al.* (2016) *Biotechnol. Lett.* **38**, 1203−1211

cell-free protein expression system, Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, site saturation mutagenesis

講演番号：4J29a11
講演日時：3 月 20 日 12:00～ J 校舎 29 会場

# グリコサミノグリカンの輸送に関わる細菌由来基質結合タンパク質のドメインダイナミクス

# Domain dynamics of bacterial solute-binding protein involved in import of glycosaminoglycans

○老木 紗予子[1]、蒲地 玲子[2]、三上 文三[1,2]、村田 幸作[3]、橋本 渉[1,2] ([1]京大院・農、[2]京大・農、[3]摂南大・理工)
○ Sayoko OIKI[1], Reiko KAMOCHI[2], Bunzo MIKAMI[1,2], Kousaku MURATA[3], Wataru HASHIMOTO[1,2] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Fac. Agric., Kyoto Univ., [3]Fac. Sci. Eng., Setsunan Univ.)

【背景と目的】酸性多糖グリコサミノグリカン（GAG）は、ウロン酸とアミノ糖の二糖を基本単位とし、動物細胞外マトリックスの主要な構成要素である。GAG を定着や感染の標的とする細菌において、GAG の分解・代謝機構に関する研究は進んでいるが、その輸送機構については不明な点が多い。これまでに、細菌による GAG 取り込み系として初めて、連鎖桿菌（*Streptobacillus moniliformis*）の基質結合タンパク質（Smon0123）依存 ABC トランスポーターを分子同定した。連鎖桿菌は齧歯類口腔内に常在するグラム陰性細菌であり、鼠咬症の病原菌である。本輸送体は、連鎖桿菌のゲノムにおいて、GAG の分解・代謝酵素群と共に一つの遺伝子クラスターにコードされており、細胞外で多糖リアーゼによって断片化された GAG 二糖を細胞質内に取り込む。本発表では、ABC トランスポーターに基質を受け渡す Smon0123 による基質認識機構を解明するため、Smon0123 の基質非結合体および基質結合体の立体構造を比較した。

【方法と結果】Smon0123 の基質非結合体および基質結合体の立体構造を X 線結晶構造解析により決定した。基質には、GAG の一種であるコンドロイチン硫酸が断片化されて生じる種々のコンドロイチン硫酸不飽和二糖を用いた。これらは硫酸基の位置や数が異なり、硫酸基をもたないものを CΔ0S、硫酸基をアミノ糖残基の C4 位と C6 位にそれぞれ一つもつものを CΔ4S と CΔ6S、硫酸基を C4 位と C6 位に二つもつものを CΔ4S6S とする。構造解析の結果、各結晶の空間群は、基質非結合体が $P2_1$、CΔ0S、CΔ4S、および CΔ6S との結合体が $P2_12_12_1$、CΔ4S6S との結合体が $P1$ であった。Smon0123 は二つのドメインからなり、基質非結合体では両ドメインが大きく開いた状態であるのに対し、基質結合体では閉じることが分かった。このような開閉は、ドメイン間をつなぐループの構造変化に起因する。特に、CΔ0S、CΔ4S、および CΔ6S との結合体は非結合体と比べて 47°閉じた構造を示す一方で、CΔ4S6S との結合体における開閉度は 39°であった。また、CΔ0S、CΔ4S、CΔ6S との結合体において、基質結合サイトに位置する Lys-210 はリジッドな構造をとっていたが、CΔ4S6S との結合体ではこの Lys 残基は構造的にフレキシブルであった。

【考察】Smon0123 はドメインの開閉によって GAG 二糖と結合・解離し、ABC トランスポーターへ受け渡すことが示された。また、Lys-210 の配置が Smon0123 の基質結合体におけるドメイン開閉度に影響していると考えられる。以上のことから、Smon0123 の構造変化は、基質の有無や基質を構成する硫酸基の数に起因すると示唆された。

glycosaminoglycan, Streptobacillus, ABC transporter

発表責任者：橋本　渉（whasimot@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4J30a01
講演日時：3 月 20 日 09:20～ J 校舎 30 会場

ナノ粒子表面の局所表面プラズモン共鳴効果を用いたウイルスの高感度・迅速検出とその汎用性の検討
Versatility of a localized surface plasmon resonance-based gold nanoparticle-alloyed quantum dot nanobiosensor for ultrasensitive immunofluorescence detection of viruses

○竹村 謙信[1]、オルワセサン アデゴケ[2]、加藤 竜也[1,2]、鈴木 哲朗[3]、朴 龍洙[1,2] ([1]静岡大院・総合科技研・農学専攻・応生化、[2]静大グリーン科技研、[3]浜医大・医・医学科)
○Kenshin Takemura[1], Adegoke Oluwasesan[2], Tatuya Kato[1,2], Tetsuro Suzuki[3], Enoch Y Park[1,2] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Fac. Agric., Shizuoka Univ, Res Inst., [2]Green Sci Technol. Shizuoka Univ. Bioscience, [3]Dept. Infectious Disease, Hamamatsu Univ. Sch. Medicine.)

【背景・目的】近年、種々のウイルス感染症が世界的な広がりを見せ、猛威を振るっている。有効な治療薬が存在しないウイルス種も存在するために、そのようなウイルス種のパンデミックが起きた場合には甚大な被害が予想される。そのため、高感度かつ迅速な診断が可能な検出系の構築による感染拡大の阻止が最も有効な対策である。本研究では国内で毎年多くの感染者が確認されるインフルエンザウイルス(IV)及びノロウイルス (NV)をターゲットとし、蛍光性半導体ナノ粒子(quantum dot, QD)と金ナノ粒子(AuNP)を用いた局所表面プラズモン共鳴蛍光増強効果による高感度・迅速診断検出法の開発を試みた。
【方法】1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC)-N-hydroxysulfosuccinimide sodium salt (NHS)を用いた EDC/NHS カップリングにより、本研究室で作成した CdTeSeS core QD と AuNP の表面上に、目的ウイルスに特異的な抗体を修飾した。抗体を修飾した Ab-QD や Ab-AuNP を遠心濾過デバイスより精製し、精製 Ab-QD と Ab-AuNP を超純水に一定の割合で混合したものを検出液とした。被検体（目的ウイルス）は H1N1 インフルエンザウイルス（A/New Caledonia / 20 /99)、ノロウイルス様粒子（NoVLP、浜医大）を用いた。この検出液に被検体を含む溶液を加え、一定時間後蛍光強度を測定した（励起光 450 nm、蛍光 636 nm)。また、患者の血液中など夾雑タンパク質が多く存在する中での被検体の検出のためヒト血清中の IV の検出も行った。
【結果】作製した QD は 636 nm の蛍光波長を有し、量子効率は 57%と非常に高い蛍光特性を有するナノ粒子であった。動的光散乱法（DLS）を用いた粒径測定より平均粒径は 9.8 nm であった。また、作製した AuNP は 280 nm 吸光波長を有し、平均粒径は 45.3 nm の金平糖型形状の粒子であった。本検出系に被験体溶液を検出液に加えてから 5 分以内に被検体を検出でき、既存の迅速診断キットに比べて飛躍的な検出時間を短縮することができた。IV と NoVLP については、それぞれ 10～100 pg/mL の範囲で直線関係であった。また、検出限界は IV で 1.1 pg/ml、NoVLPs で 1.3 pg/ml と低濃度での検出が可能であった。ヒト血清中における IV 検出では 4.7 pg/ml を検出限界とし、若干の感度低下がみられたが、夾雑タンパクが存在する溶液中においても特異的なウイルス検出が可能であることが明らかになった。

immunofluorescence, quantum dot, virus

発表責任者：竹村　謙信（kenpi901@yahoo.co.jp）

講演番号：4J30a02
講演日時：3 月 20 日 09:35～ J 校舎 30 会場

# CdZnSeS 量子ドット - 分子ビーコンナノバイオセンサーを用いたノロウイルスの高感度検出法
# Ultrasensitive norovirus detection using CdZnSeS quantum dot-molecular beacon nanobiosensor

○森田 真広[1]、アデゴケ オルワセサン[2]、加藤 竜也[1,2]、朴 龍洙[1,2] ([1]静大農　応生化、[2]静大　グリーン科技研)
○Masahiro Morita[1], Oluwasesan Adegoke[2], Tatuya Kato[1,2], Enoch Y Park[1,2] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem. Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. & Technol. Shizuoka Univ.)

【背景と目的】感染性胃腸炎を引き起こすノロウイルスは、少ないウイルスでも感染力が強く、毎年冬季に多くの感染者を出している一本鎖の RNA ウイルスである。現在、ノロウイルスの診断は、イムノクロマト法に拠るが、低感度、診断誤差や特異性に問題があり、高感度で迅速にノロウイルスを検出する技術開発が急務である。本研究では、ノロウイルスの RNA に特異的な配列を含む分子ビーコンを用いることで、高感度で迅速にノロウイルスの検出を試みた。また、量子効率の高い量子ドットの作製に成功し、分子ビーコンの検出感度を向上した。
【方法】本研究室で作成した CdZnSeS quantum dot (QD)を分子ビーコンの蛍光物質として用いた。ノロウイルスの特異的 RNA 塩基配列 GAATTAGCTTGTATGATGTC と GCGAC をそれぞれ分子ビーコンのヘアピンとステム配列とした。(1-ethyl-3-‘dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC)と N-hydroxysulfosuccinimide sodium salt (NHS) を用いた EDC/NHS カップリング反応によって、分子ビーコンの 5’末端に QD を、3’末端にはクェンチャー（BHQ1）を結合させ、分子ビーコンプローブを作製した。QD を結合させた分子ビーコンの溶液に被検体としてノロウイルスの RNA を加え、蛍光強度を測定（励起光 450 nm、蛍光 630 nm）した。
【結果】使用した QD は二酸化ケイ素で修飾されており、量子効率は 98%、蛍光波長が 630 nm であった。TEM の画像より、作製した QD の平均粒形が 6.7 nm の球状の粒子であることが確認できた。蛍光強度は、RNA の濃度依存的に増強した。検出時間は、検出液に加えてから 3 分以内であった。超純水中でノロウイルス RNA 2~16 copies/ml の範囲で検出を行ったところ、RNA 2~8 copies/ml で直線性が認められた。また、ヒト血清中のノロウイルス RNA も問題なく検出できた。本方法の検出限界は 8.2 copies/mL であり、RT-PCR 法に比べ、500 倍高い感度であった。本研究の成果は、RNA や DNA を高感度で迅速に検出することでき、今後ウイルスを迅速に検出するナノセンサーとして期待される。

quantum dot, molecular beacon, norovirus RNA

講演番号：4J30a03
講演日時：3 月 20 日 09:50～ J 校舎 30 会場

# 金ナノ粒子の堆積により形成された膜を用いたウイルスの高感度免疫蛍光速検出

# Self-assembly of gold nanoparticles on substrate and application on ultrasensitive immunofluorescence detection of viruses

○朴 龍洙[1]、アーメド シェドラヒン[1]、キム ジョンヒョ[2]、トラン ヴァンタン[2]、リ ジェボン[2]、鈴木 哲朗[3] ([1]静大・グリーン科技研、[2]釜山大・ナノ融合工、[3]浜医大・医・医学科)
○Enoch Y. PARK[1], Syed Rahin Ahmed[1], Jeonghyo Kim[2], Van Tan Tran[2], Jaebeom Lee[2], Tetsuro Suzuki[3] ([1]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka University, [2]Dept. Nano Fusion & Cogno-Mechatronics Eng., Pusan National Univ., [3]Dept. Infectious Disease, Hamamatsu Univ. Sch. Medicine)

【背景・目的】化学的なリンカーや物理的相互作用が必要ないナノ材料の表面は、電気、光学及び触媒的性質を利用できるため魅力的である。本研究では、金ナノ粒子（AuNP）を様々な材料（ガラス、ポリスチレンプレート、polydimethylsiloxane（PDMS））の表面に被覆したナノ膜の形成を試みた。さらに、AuNP 膜形成における形成メカニズムを明らかにし、形成された AuNP 膜を用いて感染症原因ウイルスの検出法を開発した。
【方法】各種材料を 100～500 mM ギ酸ナトリウムと 20 mM テトラクロリド金(III)酸（$HAuCl_4$）を超純粋に混合した混合液に入れて常温で 8 時間反応した。反応後、表面に堆積していない AuNP を数回洗浄し、AuNP 被覆膜を形成させた。EDC/NHS 反応により堆積した AuNP の表面に被検体ウイルス特異的な抗体（抗 HA H1N1）を修飾した後、被検体ウイルスを添加した。ここに抗体を修飾した陽電荷を有する（＋）AuNP を添加し、未反応 AuNP を洗浄した。洗浄後、3,3’,5,5’,-tetramethylbenzidine (TMB)と過酸化水素を加え発色反応を行った。
【結果】AuNP は、96 穴ポリスチレンプレート、PDMS、ガラス表面に単層で堆積したことを確認した。原子間力顕微鏡により、膜の厚みは 30～40 nm であった。膜形成は、材料の湿潤性と粒子間引力に依存することが明らかであった。マイクロプレートに膜を形成させ、インフルエンザウイルス H1N1 を検出したところ、10 pg/mL～10 μg/mL の直線性が認められ、検出感度は 50 pg/mL であった。臨床分離株であるインフルエンザウイルス A（H3N2）の場合、検出感度は 24.3 PFU/mL であり、従来の ELISA 法に比べ 100 バウ高感度であった。

Virus detection, Gold nanoparticle, Fluorescence

発表責任者：朴　龍洙（park.enoch@shizuoka.ac.jp）

講演番号：4J30a04
講演日時：3 月 20 日 10:05～ J 校舎 30 会場

# 亜リン酸を用いた新規生物学的封じ込め手法の開発

# A Novel biocontainment strategy makes bacterial growth dependent on phosphite

○廣田 隆一[1,2]、桂浦 善一郎[1]、野口 麗次[1]、森部 重彬[1]、舟橋 久景[1]、池田 丈[1]、黒田 章夫[1,2] ([1]広大先端研、[2]JST-ALCA)
○Ryuichi HIROTA[1,2], Zen-ichiro KATSUURA[1], Reiji NOGUCHI[1], Shigeaki MORIBE[1], Hisakage FUNABASHI[1], Takeshi IKEDA[1], Akio KURODA[1,2] ([1]Hiroshima Univ., [2]JST-ALCA)

【目的】高度な遺伝子・ゲノム加工技術や代謝工学の発展によって、様々な有用形質を有する遺伝子組み換え生物（GMO）の開発が可能になってきている。さらに現在、これらの GMO の利用は農業、医療、環境浄化など物理学的な封じ込めに限定されない領域に拡大しつつある。GMO の環境中への漏出を防止し安全性を高めるための技術は、開発される GMO の実用化とバイオ産業発展のために必要不可欠である。リン（P）は ATP や核酸などの成分として、全ての生命にとって必須の成分である。本研究では、通常の生物が利用できない亜リン酸（$HPO_3^{2-}$）を代謝するバクテリアの機能を利用し、天然には存在しないリンの供給によって生物の増殖をコントロールするという全く新しい概念の生物学的封じ込め技術を開発したので報告する。
【方法・結果】当研究室では、土壌細菌 *Ralstonia* sp. 4506 に見出された亜リン酸酸化酵素遺伝子 *ptxD* を導入し、様々な生物に亜リン酸資化性を付与することに成功している。亜リン酸は酸化数+III の還元型のリン化合物であり、環境中にはほとんど存在しない。そこで、亜リン酸資化性を与えられた生物がリン酸（$PO_4^{3-}$）を利用できなくなれば、亜リン酸が得られない環境下では生存できず、リンの要求性による生物学的封じ込めが可能となると考えた。このコンセプトの実現には亜リン酸のみを取り込む輸送体が必要であったが、これまでに知られていたリン輸送体は、亜リン酸と同時にリン酸も輸送するというジレンマがあった。興味深い事に、*Pseudomonas stutzeri* WM88 株由来の次亜リン酸（$H_2PO_2^-$）輸送体 HtxBCDE を調べたところ、次亜リン酸および亜リン酸を輸送し、リン酸を輸送しない事を見出した。大腸菌をモデルとしてリン酸輸送体（PitA, PitB, PstSCAB, PhnCDE）およびリン酸エステル輸送体（GlpT, UgpB, UhpT）をすべて欠損させ、PtxD と HtxBCDE を導入したところ、亜リン酸のみに生育を依存する株 RN1008 を作り出すことに成功した。本手法は高い封じ込め効果と、要求物質（亜リン酸）の経済性、作製原理のシンプルさを兼ね備えた、実用的な生物学的封じ込め手法として利用できると期待される。

biocontainment, phosphite, synthetic biology

発表責任者：廣田隆一（hirota@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：4J30a05
講演日時：3 月 20 日 10:20～ J 校舎 30 会場

# 亜リン酸要求性大腸菌の生物学的封じ込め効果と増殖特性解析

# Characterization of a biologically contained Escherichia coli strain dependent on phosphite

○桂浦 善一朗[1]、廣田 隆一[1,2]、船橋 久景[1]、池田 丈[1]、黒田 章夫[1,2]（[1]広大院・先端研、[2]JST-ALCA）
○Zen-ichiro KATSUURA[1], Ryuichi HIROTA[1,2], Hisakage FUNABASHI[1], Takeshi IKEDA[1], Akio KURODA[1,2] ([1]Hiroshima Univ., [2]JST-ALCA)

【目的】遺伝子組換え生物の開発と利用は、食品、医療をはじめとする様々な分野に拡大しつつあり、物理学的封じ込めを施すことが困難な状況での利用においては、環境中に漏出した際のリスクを低減するための方策が求められている。当研究室では大腸菌をモデルとして、亜リン酸（$HPO_3^{2-}$）の要求性による生物学的封じ込め手法を開発した。本手法では、亜リン酸の資化能力を *Ralstonia* sp. 4506 株由来の亜リン酸デヒドロゲナーゼ（PtxD）によって付与し、内在性リン酸輸送体の破壊と、亜リン酸/次亜リン酸のみを輸送する *Pseudomonas stutzeri* 由来 HtxBCDE タンパク質を発現させることで、亜リン酸に依存する性質を創り出すことできる。亜リン酸は環境中にはほとんど存在しないため、本手法は生物学的封じ込め手法として利用されることが期待される。本研究では、亜リン酸を用いた生物学的封じ込め手法の有効性を評価するため、大腸菌において作製した亜リン酸要求性株 RN1008 の増殖非許容条件における封じ込めの効果の評価とその増殖特性について解析を行った。
【方法・結果】まず、RN1008 の封じ込め効果の評価を行うために、亜リン酸 1mM を含む MOPS-グルコース合成培地（MOPS+Pt 培地）で培養した $1.94\times10^{13}$ cells の RN1008 を、亜リン酸を含まない増殖非許容培地 （2xYT 培地）にプレーティングし、コロニーの出現を調べた。その結果、3 週間培養を継続しても、コロニーの出現は確認されず、既報の生物学的封じ込めのシステムと比較しても、非常に高い封じ込め効果が得られていることが明らかとなった。次に、様々な培地における RN1008 の増殖特性の解析を行った。その結果、亜リン酸が十分量（1mM）存在しているにもかかわらず、2xYT のようなペプトンや酵母エキスを含む複合培地では増殖が大きく抑制されることが確認された。しかしながら、72 時間以上培養を継続すると、培地に適応して速やかに生育できる適応変異株（AM）の出現が確認された。AM の増殖特性を調べたところ、MOPS+Pt 培地における増殖速度の低下が確認されたほか、$3.07\times10^{-8}$/cells の割合で亜リン酸に依存しない逃避変異株（EM）を生じることが確認された。独立して得られた 4 種の EM について、HtxBCDE 発現系として導入しているプラスミド（*htxABCDE*/pSTV）を調べた結果、全ての *htxC* に Phe210Cys のアミノ酸置換を生じる共通した変異が見出され、この変異によってリン酸を輸送できるようになった可能性が示唆された。現在、HtxC 変異による逃避メカニズムを解明すると共に、*htxBCDE* のコピー数を下げることで、逃避変異株の出現頻度を下げることができるかを検討している。

biocontainment, phosphite, mutation

発表責任者：桂浦善一朗（b130823@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：4J30a06
講演日時：3 月 20 日 10:35～ J 校舎 30 会場

# 正のフィードバック遺伝回路を用いて厳密に遺伝子の発現を制御する方法

# A tight gene regulation system using positive-feedback gene circuits

○加藤 祐輔（農研機構・生物機能）
○Yusuke KATO (NIAS, NARO)

特定の標的遺伝子の発現に必要な因子に対して、正のフィードバックをかける遺伝回路を付与することにより、高い厳密性もって遺伝子発現を制御する系を構築した。

私達は、部位特異的非天然アミノ酸導入法を応用して、特定の標的遺伝子の発現を制御する手法の開発およびその改良を進めている。この手法は、意図的に挿入したアンバー終止コドンを、ある非天然アミノ酸（Uaa）の特異的な導入により、リードスルーさせることによって成立している。すなわち、Uaa 存在下ではリードスルーが起きるので標的遺伝子の産物の翻訳が進行するが、非存在下では翻訳が中断する仕組みである。この手法における問題点のひとつは、Uaa 非存在下における翻訳の中断が不完全で、Uaa 導入系により数%～数十%の漏洩翻訳が認められることである。部位特異的な Uaa 導入には、Uaa 特異的なアミノアシルシンテターゼ（UaaRS）および基質となるアンバー抑制性 tRNA が必要である。問題となる漏洩翻訳は、UaaRS や基質 tRNA を除くと消失するので、Uaa に対する基質特異性が不完全であることによる天然アミノ酸の導入が原因と考えられた [1)]。そこで、標的遺伝子の発現停止条件である Uaa 非存在下において、UaaRS 遺伝子もしくは基質 tRNA 遺伝子の発現を抑制する正のフィードバック遺伝回路を導入し、漏洩翻訳の抑制を試みた。モデル系として、非天然アミノ酸 3-ヨウ化-L-チロシンの導入系を用いた [2)]。その結果、開始コドン直下にアンバー終止コドンを挿入した標的遺伝子（EGFP）の漏洩発現は著しく抑制された。また、トリプトファンオペレーターを改変して作られた Uaa オペレーター[3)]により、標的遺伝子に特異的な転写の制御も可能だが、この転写制御においても、同様に漏洩発現を抑制することができた。導入した正のフィードバック遺伝回路によって、漏洩発現を極端に小さくできるもの、最大発現量を保ったまま漏洩発現を抑制できるもの、など様々な特性を示した。Uaa による遺伝子特異的な発現調節は、人工的な Uaa 栄養要求性による生物学的封じ込め法 [4,5)]の技術的基盤であることから、本技術はその実用化のための遺伝的パーツとして寄与できるだろう。

[1] Minaba, M. & Kato, Y. (2014) *Appl. Environ. Microbiol.* **80**:1718
[2] Sakamoto *et al.,* (2009) *Structure* **17**:335
[3] Liu CC *et al.,* (2011) *Nat Biotechnol* **29**:164
[4] Rovner A et al. (2015) Nature **518**:89
[5] Kato Y (2015) PeerJ **3**:e1247

Tight control of gene expression, Biological containment, Synthetic biology

発表責任者：加藤祐輔（kato@affrc.go.jp）

講演番号：4J30a07
講演日時：3 月 20 日 11:00～ J 校舎 30 会場

*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus を用いた哺乳動物細胞への外来遺伝子導入
Gene transduction into mammalian cells by *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus
杉岡 沙紀[1]、板垣 滉平[1]、○加藤 竜也[1,2]、朴 龍洙[1,2]([1]静岡大農、[2]静岡大グリーン科技研)
Saki Sugioka[1], Kohei Itagaki[1], ○Tatsuya Kato[1,2], Enoch.Y Park[1,2] ([1]Shizuoka Univ., [2]Shizuoka Univ. RIGST)

【背景・目的】バキュロウイルスは昆虫や昆虫細胞を用いた組換えタンパク質発現に広く用いられている。さらに、*Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV)は、複製はしないが哺乳動物細胞にも侵入できることが知られており、遺伝子治療を目的とした外来遺伝子導入のウイルスベクターとして研究が行われている。しかし、カイコを用いた組換えタンパク質発現で用いられる *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV)は、AcMNPV に比べ哺乳動物細胞への外来遺伝子導入効率が非常に悪い。本研究では、BmNPV の哺乳動物細胞への遺伝子導入効率を改善するために、AcMNPV 由来のエンベロープタンパク質 GP64 (AcGP64) を持つ組換え BmNPV を作製して、その遺伝子導入効率を評価した。
【方法】BmNPV バクミド内の BmNPV が持つエンベロップタンパク質 GP64 (BmGP64) をコードする遺伝子をλRed recombinase によりクロラムフェニコール耐性遺伝子を挿入することで破壊して、BmNPVΔbgp を作製した。次に p10 プロモーター下流に AcGP64 遺伝子、サイトメガロウイルス前初期プロモーター (CMV プロモーター) 下流に EGFP 遺伝子を持つ遺伝子発現カセットを BmNPVΔbgp に挿入することで、それら 2 つの発現カセットを持つ BmNPVΔbgp/AcGP64/EGFP バクミドを構築した。またコントロールとして、p10 プロモーター下流に BmGP64 遺伝子、CMV プロモーター下流に EGFP 遺伝子を持つ BmNPVΔbgp/BmGP64/EGFP バクミドを構築した。これら組換え BmNPV バクミドをカイコ幼虫に注射してそれぞれの組換え BmNPV を調製し、ショ糖密度勾配遠心分離により部分精製した。それぞれの組換え BmNPV を感染多重度 (M.O.I.) 50 から 300 で HEK293T 細胞に加え、2 日後細胞内の EGFP 蛍光を観察した。また CMV プロモーター下流に EGFP 遺伝子を持つ BmNPV (BmNPV/EGFP)も作製した。
【結果および考察】BmNPV/EGFP および BmNPVΔbgp/BmGP64/EGFP では HEK293T 細胞内での EGFP 発現が確認されなかった。BmNPVΔbgp/AcGP64/EGFP では M.O.I.300 で遺伝子導入効率は低かったが (13%)、HEK293T 細胞での EGFP 発現が確認された。このことから AcGP64 により BmNPV の HEK293T 細胞への外来遺伝子導入が可能になることが示された。AcMNPV と BmNPV の外来遺伝子導入効率の違いは、それぞれのエンベロップタンパク質 GP64 の性質の違いによると推測された。

BmNPV, gene transduction, mammalian cell

発表責任者：加藤竜也（kato.tatsuya@shizuoka.ac.jp）

講演番号：4J30a08
講演日時：3 月 20 日 11:15～ J 校舎 30 会場

# カイコ-BmNPV バクミド発現系による MERS-CoV の組換え S タンパクの発現と精製

# Expression of recombinant S protein from MERS-CoV using silkworm-BmNPV Bacmid expression system and purification

○高見 佳宏、ビピンクマール デオ、加藤 竜也、朴 龍洙（静大農・応生化）
○Yoshihiro TAKAMI, Deo Vipin Kumar, Tatsuya KATO, Enoch Y. Park (Shizuoka Univ.)

【目的】中東呼吸器症候群（MERS）とは MERS コロナウイルス（MERS-CoV）によって引き起こされる感染症で、2012 年以降中東地域を中心に広く発生している。感染力は低いと考えられているがその致死率はおよそ 40%に達し、2015 年の韓国での MERS の流行では多数の死者を出した。しかし、いまだ有効なワクチン等は開発されていないため、早期診断に必要な高感度・迅速な検出が求められている。本研究ではカイコ–*Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus (BmNPV)バクミド発現系を用いて、MERS-CoV の受容体結合タンパク質であるスパイク（S）タンパク質をカイコ幼虫体で発現させ、精製を行った。

【方法】MERS-CoV の S タンパク質をコードする遺伝子から PCR によって c-Myc tag 配列等を付加し、膜貫通領域を除いた組換え S タンパク質（SΔTM）遺伝子を作製した。SΔTM 遺伝子をカイコと大腸菌のシャトルベクターである *Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus (BmNPV)バクミドに組み込み、組換え BmNPV/SΔTM バクミドを構築した。BmNPV/SΔTM バクミドをカイコ幼虫に注射し、5 日後体液を回収してウエスタンブロッティングを行い SΔTM タンパク質の発現を確認した。得られた体液を c-Myc tag アフィニティー精製を行い、精製 SΔTM タンパク質を解析した。

【結果】組換え BmNPV/SΔTM バクミドをカイコ幼虫に注射後 5 日間飼育した後、カイコ幼虫の体液約 38ml を回収した。ウエスタンブロットにより、体液中に予想される分子量である約 160 kDa に特異的なバンドが検出され、SΔTM がカイコ幼虫内で発現して体液中に分泌されていることが確認された。SΔTM を c-Myc tag アフィニィティー樹脂 0.5 ml を用いて精製を行った結果、カイコ一頭当たり約 8.3 μg の組換え S タンパク質を得た。このとき同時に分子量が小さい SΔTM が精製され、一部がプロテアーゼで切断されていることが確認された。この組換え S タンパク質を用いて、MERS-CoV が感染する際の受容体となる dipeptidyl peptidase 4(DPP4, CD26)との結合性について ELISA で解析を行う。

Silkworm, BmNPV Bacmid, MERS-CoV

発表責任者：高見　佳宏（n6vermynd3@gmail.com）

講演番号：4J30a09
講演日時：3 月 20 日 11:30～ J 校舎 30 会場

# カイコ-BmNPV バクミド系で発現させた熱帯熱マラリア原虫抗原の解析

Characterizationof *Plasmodium falciparum* antigen expressed in silkworm

○稲垣 裕[1]、宮崎 剛亜[1,2]、加藤 竜也[1,2]、朴 龍洙[1,2] ([1]静大院・農・応生化、[2]静大グリーン科技研)
○Yu Inagaki[1], Takatsugu Miyazaki[1,2], Tatsuya Kato[1,2], Enoch Y. Park[1,2] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Fac. Agric., Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. Technol., Shizuoka Univ.)

【背景・目的】マラリアとは、プラスモジウム属に分類される寄生性原虫によって引き起こされる原虫感染症である。マラリア原虫はヒト体内で肝臓と赤血球内に寄生し、それぞれ形態を変化することが知られている。そのため効果的なワクチン開発が困難であるが、各形態の抗原を同時に免疫することで効果的にマラリアを予防できることが期待される。本研究では、マラリア原虫の各形態に対応したワクチンの開発の基盤構築のために、スポロゾイトとメロゾイトのそれぞれ異なる形態のマラリア原虫表面に発現しているタンパク質である CSP (Circum Sporozoite Protein)と MSP3 (Merozoite Surface Protein 3)について、カイコ-BmNPV バクミド発現系を用いて発現・精製を行い、精製タンパク質の生化学的解析を Blue-Native-PAGE、Congo Red 染色により行った。
【方法】*Plasmodium falciparum* 3D7株のCSPとMSP3 (PfCSPとPfMSP3) 遺伝子を、カイコで発現可能な *Bombyx mori*nucleopolyhedrovirus (BmNPV) バクミドに挿入することで組換えBmNPV バクミドを構築した。CSPの場合、C末端側の膜貫通領域を欠損させ、そこにFLAGタグを挿入したPfCSPΔTM-FLAGとして、MSPの場合、N末端側の膜貫通領域を欠損させカイコ由来ボンビキシンシグナル配列を付加し、C末端側にFLAG配列を付加したPfMSP3ΔTM-FLAGとして発現した。カイコで発現した組換えタンパク質をアフィニティーゲルにより精製を行った。さらに精製タンパク質の特徴を解析した。
【結果】PfCSPΔTM-FLAG（60kDa）とPfMSP3ΔTM-FLAG（53kDa）はともにカイコ体液中および脂肪体内に発現が確認された。アフィニティーゲルにより精製を行ったところ、カイコ一頭あたり（分泌タンパク質として）、PfMSP3ΔTM-FLAGは130 μg、PfCSPΔTM-FLAG 部分精製物は18.5 μg 得られた。精製したPfMSP3ΔTM-FLAGについては、オリゴマー化してアミロイド繊維構造を形成することが知られているため、Blue-Native PAGEを行ったところ、SDS-PAGEで得られるバンドサイズと比較し、オリゴマー化されていることが確認された。またコンゴーレッド染色により、吸光スペクトルの変化が認められアミロイド繊維構造が形成されていることが確認された。このことから、カイコ幼虫はマラリア抗原の大量発現に適した発現宿主であることが示唆された。

Silkworm, Plasmodium falciparum, Antigen

講演番号：4J30a10
講演日時：3 月 20 日 11:45～ J 校舎 30 会場

# 抗体を整列固定化する平面膜の開発

# Planner membrane displaying antibodies in an oriented immobilization manner

○飯嶋 益巳、黒田 俊一（阪大・産研）
○Masumi IIJIMA, Shun'ichi KURODA (ISIR, Osaka Univ.)

我々は、バイオセンサー表面で IgG の Fc 領域を固定して Fv 領域を放射状に提示できる足場分子である、Protein A 由来 Fc 結合 Z ドメイン提示型バイオナノカプセル（ZZ-BNC）を開発した［１］。ZZ-BNC は IgG［２－４］及びヒト IgG1 Fc 融合受容体［５］をセンシング分子とする各種バイオセンシングの検出感度を著しく改善すると共に、センシング分子の使用量を著しく減らした。さらに、ZZ-BNC は化学的・物理的ストレスに対して堅牢性が高く、酸処理を繰り返しても、粒子構造を保持してセンサー基板に結合し、センシング分子を整列化した［３］。しかし、ZZ-BNC はドーム構造（高さ約 18 nm、直径約 50 nm）［６］のため、ZZ-BNC 構造タンパク質（ZZ-L タンパク質）が基板側で余剰になることや、生体分子間相互作用を基板表面近傍（数 nm 以内）で検出する表面プラズモン共鳴（SPR）やエリプソメトリー等で ZZ-BNC の効果が現れにくいことが課題であった。そこで本研究では、基板上に ZZ-L タンパク質を埋め込んだ二次元膜を展開し、センシング分子を基板面に垂直に整列固定化できる平面膜の開発を目指した。

ZZ-BNC を各種界面活性剤で処理して、透過型電子顕微鏡及び原子間力顕微鏡により形状を観察したところ、5% Tween 80 処理した ZZ-BNC は、ドーム構造からミセル構造（ZZ-L ミセル、高さ約 0.4 nm、直径約 10.0 nm）に変化した。次に、基板上にリポソームを接触させて平面膜を形成し、ZZ-L ミセルと接触させたところ、同ミセルは脂質一重膜上でクラスターを形成しながら整列化した。さらに、水晶発振子微量天秤（QCM）及び SPR のセンサーチップ上に、本 ZZ-L 埋込型平面膜を形成させ、IgG を提示して抗原検出を行った。その結果、同じ抗体量を使用する ZZ-BNC と比較して、QCM では 1 抗体分子に結合する抗原量は変わらなかったが、総抗原結合量は約 6 倍上昇し、SPR でも総抗原結合量は約 4 倍上昇した。以上から、既に実績のある抗体整列化用足場分子 ZZ-BNC よりも、ZZ-L 埋込型平面膜は一層有効であることが判明した。同平面膜は様々な形状に加工可能であることから、今後は広範なバイオセンサーの高感度化について検討する予定である。

［１］Iijima, M. et al. Biosens. Bioelectron. in press. ［２］Iijima, M. et al. Anal. Biochem. 396, 257-261 (2010). ［３］Iijima, M. et al. Biomaterials 32, 1455-1464 (2011). ［４］Iijima, M. et al. Biomaterials 32, 9011-9020 (2011). ［５］Iijima, M. et al. Biotechnol. J. 11, 805-813 (2016). ［６］Iijima, M. et al. Sci. Rep. 2, 790 (2012).

Bio-nanocapsule, planar membrane, oriented immobilization

講演番号：4J30a11
講演日時：3 月 20 日 12:00～ J 校舎 30 会場

pVEC 関連ペプチドの構造と植物細胞透過性の関係
Relationship between structure and plant cell penetration efficiency of *p*VEC-related peptides
○林 真由、宮下 正弘、宮川 恒（京大農）
○Mayu HAYASHI, Masahiro MIYASHITA, Hisashi MIYAGAWA (Kyoto Univ.)

【目的】細胞透過性ペプチドは、タンパク質などの親水性分子に融合させることにより、速やかにそれらの分子を細胞内へ移行できるため、ベクターとしての応用が期待されている。我々はこれまでに、4 から 8 残基のアルギニンから成るオリゴアルギニン（$R_n$; n=4-8）がタバコ細胞内へ移行することを確認しているが、細胞壁に強く吸着するという問題があった。また、オリゴアルギニンとは異なる機構で細胞内に移行すると考えられている *p*VEC（LLIILRRRIRKQAHAHSK-$NH_2$）はオリゴアルギニンに比べ高い透過性を示すだけでなく、細胞壁への吸着も低いことを明らかにしている。*p*VEC の低い吸着性が *p*VEC の N 末端疎水性領域（LLIIL）によってもたらされていると考えられたことから、この配列をオリゴアルギニンに導入したところ、このペプチド（LLIIL$R_n$-$NH_2$; n=4-8）は *p*VEC とほぼ同等の透過性、吸着性を示すようになった。そこで本研究ではペプチドの構造と透過性の関係についてさらに知見を得るために、LLIIL$R_4$-$NH_2$ について N 末端疎水性領域の残基数を減少させた場合の影響について、またアルギニンを他の塩基性アミノ酸（リジンやヒスチジン）に置換した場合の植物細胞に対する透過性について評価した。
【方法】ペプチドは Fmoc 固相合成法により合成した。蛍光標識化は、5(6)-carboxyfluorescein の N 末端アミノ基への導入によりおこなった。透過効率については、それぞれのペプチドをタバコ懸濁細胞に 30 分間処理し、細胞の洗浄ならびにプロテアーゼによる吸着ペプチドの除去後に抽出操作を行い、これを蛍光分光光度計で測定することにより算出した。細胞壁への吸着量については、トリプシン処理後のろ液を蛍光分光光度計で測定することで算出した。
【結果】LLIIL$R_4$-$NH_2$ はその疎水性アミノ酸の残基数が減るにつれて透過性は減少するとともに、細胞壁への吸着は増加した。この結果から、少なくとも 4 残基の疎水性領域（LIIL）が効率的な透過に必要であることが示唆された。また、リジンやヒスチジンを導入したペプチド（LLIIL$K_4$-$NH_2$、LLIIL$H_4$-$NH_2$）はアルギニンを導入したペプチド（LLIIL$R_4$-$NH_2$）と同様に高い透過性を示した。中でも、ヒスチジンを導入したペプチドが最も高い透過性を示した。一方、細胞壁への吸着はいずれの塩基性アミノ酸を用いた場合も同程度に低かった。これらの結果より、一定の長さの N 末端疎水性領域が高い透過性に必要であること、また、塩基性残基として必ずしもアルギニンを必要としないことが示唆された。

cell penetrating peptide, plant cell

発表責任者：宮下正弘（miyamasa@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4J31a01
講演日時：3 月 20 日 09:20～ J 校舎 31 会場

野生イネにおけるファイトアレキシン生合成遺伝子クラスター領域の転写動態とその制御因子の進化
Dynamics of transcription from phytoalexin biosynthesis gene clusters and evolutionary analysis of their trans-regulators in *Oryza* species

○冨山 詩歩[1]、川原 玲香[2]、宮本 皓司[3]、山根 久和[3]、Shenton Matthew[4]、倉田 のり[4]、豊増 知伸[5]、野尻 秀昭[1]、岡田 憲典[1] ([1]東大生物工学セ、[2]東農大ゲノムセ、[3]帝京大バイオ、[4]遺伝研、[5]山形大農)
○Shiho TOMIYAMA[1], Ryouka Kawahara[2], Koji MIYAMOTO[3], Hisakazu YAMANE[3], Matthew Shenton[4], Nori KURATA[4], Tomonobu TOYOMASU[5], Hideaki NOJIRI[1], Kazunori OKADA[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Tokyo Univ. of Agric., [3]Teikyo Univ., [4]NIG, [5]Yamagata Univ.)

【背景と目的】植物の防御応答の一つとして、ストレス誘導性の抗菌性低分子化合物ファイトアレキシンの生産が知られている。栽培イネ *Oryza sativa* が生産する主要なジテルペン型ファイトアレキシンであるファイトカサン類とモミラクトン類は、それらの生合成遺伝子群がそれぞれ染色体上でクラスターを形成している。我々は野生イネにおけるこれらのクラスターの存在について追究し、*Oryza* 属のファイトアレキシン生産能が、生合成クラスターの構築と共に育種前の野生イネにおいて獲得されていたことを報告した。さらに、ファイトアレキシン生産能を持たない野生イネにおいても、一部のファイトアレキシン生合成遺伝子については、相同性の高いホモログが栽培イネのゲノム上のクラスター領域とシンテニーを保ち存在することもわかった。本研究では、塩化銅ストレス処理時の野生イネのトランスクリプトーム解析から、クラスター領域におけるファイトアレキシン生産関連遺伝子の発現動態を調べ、そこに座乗する遺伝子の発現とクラスター形成との関係を明らかにする。また、ファイトアレキシン生産制御を担う転写制御因子の野生イネから栽培イネへの進化についても追究する。

【方法と結果】ゲノムタイプが異なり進化的距離を保った 4 種の野生イネ(*O. rufipogon*, *O. punctata*, *O. brachyantha*, *Leersia perrieri* )について、塩化銅処理後の経時的なファイトアレキシン生産を検討した。イネ葉身を 500 μM 塩化銅水溶液中で 72 時間浸漬処理し、複数の経時点におけるファイトアレキシン蓄積量を LC-MS/MS を用いて測定した。また、同様のサンプルから total RNA を抽出し、ファイトアレキシン生合成酵素関連遺伝子の発現変動を RT-PCR により解析した。その結果、*O. brachyantha* を除く 3 種において塩化銅処理後 24 時間でファイトアレキシンの誘導的な蓄積が見られ、また、4 種すべてにおいてファイトアレキシン生合成酵素関連遺伝子の発現誘導が確認できた。そこで、塩化銅処理後 24 時間と未処理の葉身から抽出した total RNA を用いて RNA-seq を行った。クラスター領域内に存在する遺伝子の発現プロファイルを見てみると、ファイトアレキシン生産能の有無にかかわらず野生イネにおいてもストレス誘導性の発現が認められた。この結果は、野生イネにおける栽培イネと同様なファイトアレキシン生合成遺伝子の転写制御機構の存在を示唆している。また、*O. sativa* のファイトアレキシン生産制御因子である転写因子 DPF や OsTGAP1 が、4 種すべての野生イネの染色体の同一な場所に存在し、発現していることもわかった。現在、これらのファイトアレキシン生産制御因子の進化的な分子機能の変遷について解析を進めている。

gene cluster, transcription, *Oryza*

講演番号：4J31a02
講演日時：3 月 20 日 09:35～ J 校舎 31 会場

イネのジテルペン型ファイトアレキシン生産における OsbZIP79 を介した転写抑制機構の解析
OsbZIP79-mediated Transcriptional Repression on the Production of Diterpenoid Phytoalexin in Rice

○渋谷 大地[1]、宮本 皓司[2]、山根 久和[2]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1] ([1]東大・生セ、[2]帝京大・理工)
○Daichi Shibuya[1], Koji Miyamoto[2], Hisakazu Yamane[2], Kazunori Okada[1], Hideaki Nojiri[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Teikyo Univ.)

【背景と目的】イネの病害抵抗性反応において蓄積する主要なジテルペン型ファイトアレキシンとして、ファイトカサン類とモミラクトン類が知られている。bZIP 型転写因子 OsbZIP79 は、ファイトアレキシン生合成遺伝子のエリシター応答性発現を正に制御する bZIP 型転写因子 OsTGAP1 の相互作用因子として同定された。両転写因子は TGA ファクターの保存モチーフや bZIP ドメイン、C 末端側に相同性の高い領域を共有している。これまでに、*OsbZIP79* 過剰発現培養細胞を用いた解析から、OsTGAP1 とは対照的に OsbZIP79 がファイトアレキシン生合成遺伝子群の発現を負に制御することが示されている。本研究では、OsbZIP79 の植物体におけるファイトアレキシン生合成遺伝子の転写制御機構の解明を目的として以下の実験を進めたので報告する。
【結果と考察】まず、*OsbZIP79* 過剰発現株と *osbzip79-Tos17* 挿入変異株を用いてジャスモン酸（JA）による根への浸漬処理後のファイトアレキシン蓄積量を LC-MS/MS で定量した。野生型株と比較すると、過剰発現株では蓄積量が減少したが、*Tos17* 挿入変異株では差が見られなかった。過剰発現株においては、ファイトアレキシン生合成につながる上流経路遺伝子の一つ *OsDXS3* について JA 処理後の経時的な遺伝子発現変動を定量的 RT-PCR で測定したところ、JA 処理 24 時間後以降の転写量が野生型株と比較して低下していた。この結果から、植物体においても OsbZIP79 がファイトアレキシン生合成の負の制御因子であることが示唆された。一方、イネ植物体における JA 処理後の *OsbZIP79* の発現量の変化を解析するべく、野生型株を用いて定量的 RT-PCR を行ったところ、根において未処理時には地上部の 16 倍の発現を示し、JA 処理 6 時間後にはその発現が抑制されることがわかった。この実験の過程で、根の Total RNA から *OsbZIP79* ORF の cDNA 増幅を行ったところ、*OsbZIP79* の転写バリアント *OsbZIP79.3* と *OsbZIP79.4* の存在が確認された。2 つの転写バリアントはイントロンの挿入によって長い塩基配列を有し、その結果、未成熟終止コドンによって短いアミノ酸配列をコードしていた。*OsbZIP79.3* と *OsbZIP79.4* に特異的なプライマーを用いて JA 処理後の経時的な遺伝子発現量を定量的 RT-PCR により測定したところ、根において *OsbZIP79.3* と *OsbZIP79.4* 共に発現減少が見られた。異なるタンパク質モチーフを有する複数の OsbZIP79 の存在は、OsTGAP1 との相互作用や OsbZIP79 同士の相互作用を介してファイトアレキシン生産制御機構に寄与している可能性が考えられる。現在、OsbZIP79 バリアントが OsTGAP1 の *OsDXS3* プロモーター制御に与える影響について、Pull-down Assay によるこれらの相互作用とレポータージーンアッセイによるエフェクター効果を追究している。

bZIP transcription factor, phytoalexin, variant

発表責任者：渋谷大地（dai428m22@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4J31a03
講演日時：3 月 20 日 09:50～ J 校舎 31 会場

# イネのジテルペン型ファイトアレキシン生産制御因子 DPF のジャスモン酸による発現誘導機構と細胞内挙動

# Inductive expression and subcellular localization of the stress-inducible transcription factor DPF relevant for the diterpenoid phytoalexin biosynthesis in rice

○田渕 雄夢[1]、堤 涼[1]、根本 圭一郎[2]、澤崎 達也[2]、森 昌樹[3]、宮本 皓司[4]、山根 久和[4]、光田 展隆[5]、野尻 秀昭[1]、岡田 憲典[1] ([1]東大・生物工学セ、[2]愛媛大・工、[3]農研機構・生物機能利用、[4]帝京大・バイオ、[5]産業技術総合研究所)

○Yumu TABUCHI[1], Ryo TSUTSUMI[1], Keiichiro NEMOTO[2], Tatsuya SAWASAKI[2], Masaki MORI[3], Koji MIYAMOTO[4], Hisakazu YAMANE[4], Nobutaka MITSUDA[5], Hideaki NOJIRI[1], Kazunori OKADA[1] ([1]the Univ. of Tokyo, [2]Ehime Univ., [3]NIAS, [4]Teikyo Univ., [5]AIST)

【背景・目的】イネにおける防御応答の一つとして、抗菌性化合物であるジテルペン型ファイトアレキシン（DP）の生産誘導が知られている。イネの DP 生合成を制御する転写因子の一つとして、いもち病菌感染や塩化銅、ジャスモン酸（JA）処理等により発現誘導を受ける bHLH 型転写因子 DPF (Diterpenoid Phytoalexin Factor）がある。DPF が制御する DP 生合成遺伝子のうち *OsCPS2* については、上流域に存在するシスエレメントの N-box（CACGAG）が DPF による転写活性化に必要であることが示されている（Yamamura *et al.*, Plant J. 84: 1100-13., 2015)。本研究では JA により顕著な誘導を受ける *DPF* 遺伝子の発現と、その後の DPF による下流 DP 生合成遺伝子の転写制御メカニズムについて解明を目指している。

【方法・結果】まず、JA による *DPF* 発現誘導メカニズムに関して、*DPF* の発現を直接制御する転写因子の探索を行った。*DPF* のプロモーター解析からその発現誘導に G-box（CACGTG）を含む領域が重要であり、酵母ワンハイブリッド法からその結合因子として JA シグナル伝達の鍵転写因子である OsMYC2 が取得された。また、*OsMYC2* の一過的発現による *DPF* の発現誘導、*OsMYC2* の RNAi 抑制株において JA による *DPF* 発現誘導の減少が見られた。これらの結果から、JA シグナルによる DP 生産誘導は、OsMYC2 を介した *DPF* の発現誘導により制御されていることが考えられる。次に、DPF による DP 生合成遺伝子制御メカニズムについて、その制御が DPF による直接的な制御であるかを調べるため、*in vitro* における DPF と *OsCPS2* 上流領域内 N-box の分子間相互作用を AlphaScreen により解析した。その結果、DPF と N-box の近接を表すシグナルが、変異導入 N-box を用いた場合と比較して約 2 倍の値を示し、DPF が N-box へ直接結合することが示唆された。さらに、*in vivo* における N-box と DPF の結合の確認と DPF のゲノム上での結合領域の網羅的解析を行うため、ChIP assay で用いる DPF 抗体の特異性評価を進めた。イネ植物体葉身から核タンパク質を抽出し、細胞質画分と共にウエスタンブロット解析を行った。その結果、野生型および *DPF* 過剰発現株では予想される位置にほぼ単一のシグナルが検出された一方、*DPF* 欠損変異株では検出されなかった。以上のことから DPF 抗体は植物体内に存在する DPF を特異的に補足していると判断された。しかし予想に反して、DPF は核ではなく主に細胞質に局在していることが明らかになった。現在、DPF がジャスモン酸応答的に細胞質から核へ移行し、DP 生合成遺伝子の発現誘導を行っている可能性を考え、ウエスタンブロッティングによる検出と DPF-GFP 融合タンパク質を用いた *in planta* での詳細な局在性解析を進めている。

transcription factor, jasmonic acid, phytoalexin

講演番号：4J31a04
講演日時：3 月 20 日 10:05～ J 校舎 31 会場

# bZIP 型転写因子 OsTGAP1 によるジテルペン型ファイトアレキシン生産制御機構の解明

# Molecular action of the bZIP type transcription factor OsTGAP1 on diterpenoid phytoalexins production in rice

○吉田 悠里[1]、宮本 皓司[2]、山根 久和[2]、野尻 秀昭[1]、岡田 憲典[1] ([1]東大・生物工学セ、[2]帝京大・バイオ)

○ Yuri YOSHIDA[1], Koji MIYAMOTO[2], Hisakazu YAMANE[2], Hideaki NOJIRI[1], Kazunori OKADA[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Teikyo Univ.)

イネの病害抵抗性反応の 1 つとして、抗菌性の specialized metabolite であるファイトアレキシンの誘導的な生産が知られている。我々はイネにおけるファイトアレキシン生産誘導機構に興味を持ち、転写因子による制御の実態解明をめざしている。キチンエリシター応答性 bZIP 型転写因子 OsTGAP1 は、モミラクトン生合成とファイトカサン生合成の各遺伝子クラスターおよび生合成上流に位置するメチルエリスリトールリン酸（MEP）経路遺伝子の転写制御に関与し、ジテルペン型ファイトアレキシン（DP）生産を誘導する転写因子としてイネの培養細胞で同定された（Okada et al., 2009）。さらに、イネ植物体における機能解析の結果、OsTGAP1 は特にイネの根において発現し、DP 生合成遺伝子の発現を正に制御することで、根における DP 生産を亢進することが示された。また、先行研究で行われた ChIP-seq 解析による OsTGAP1 の結合位置の網羅的同定から、MEP 経路の初発酵素遺伝子 *OsDXS3* の上流域に明瞭な OsTGAP1 の結合が見出され、領域に存在するシス配列（TGACGT）への OsTGAP1 の結合が *OsDXS3* の転写誘導に重要であることも明らかになった。一方で、クラスター内の生合成遺伝子 *OsKSL4, OsKSL7* 等に対しては OsTGAP1 によるプロモーター活性の増強は見られず、OsTGAP1 を介したクラスター内遺伝子の制御機構は未解明である。

このような背景のもと、OsTAGP1 によるクラスター内遺伝子の転写制御では、他の制御因子との相互作用が重要である可能性を考えて、OsTGAP1 と相互作用するタンパク質の探索を行ったところ、数種の OsTGAP1-intaracting factor（OsTIF 因子）を得た。これらの相互作用因子の中には、ヒストン修飾に関与すると考えられている ENT-domain containing protein の遺伝子 *OsTIF1*（OsTGAP1-intaracting factor1）や kinesin heavy chain タンパク質遺伝子 *OsTIF4* が含まれていた。そこで、OsTGAP1 と OsTIFs を用いたレポータージーンアッセイを行い、OsTIFs と OsTGAP1 との相互作用が DP 生合成遺伝子の転写活性化へ及ぼす影響を検討した。その結果、OsTIF1，OsTIF4 を用いた場合には、どちらの組み合わせでも *OsDXS3* のプロモーターに対する OsTGAP1 と OsTIF との協調的な転写活性化が確認された。しかし、クラスター内遺伝子である *OsKSL4* のプロモーターに対する転写誘導は認められなかった。他の相互作用因子の中には、serine/threonine kinase である OsTIF3 が含まれていた。OsTGAP1 が生体内でリン酸化修飾を受けて機能する可能性を考え、現在、OsTIF3 と OsTGAP1 とのタンパク質間相互作用がクラスター内遺伝子の発現制御に及ぼす影響について解析を進めている。

Phytoalexins, Plant defense, cluster regulation

講演番号：4J31a05
講演日時：3 月 20 日 10:20～ J 校舎 31 会場

# アーキアに発見した光合成カルビンサイクルの進化的原型

# An ancient RuBisCO-mediated carbon metabolism for the Calvin cycle in archaea

○河野 卓成[1,2]、Sandhya Mehrotra[3]、遠藤 千夏子[2]、松田 真実[4]、木村 浩之[5]、蓮沼 誠久[4]、横田 明穂[2]、松村 浩由[6]、蘆田 弘樹[1] ([1]神戸大院・人間発達環境、[2]奈良先端大・バイオ、[3]BITS Pilani、[4]神戸大院・科学技術イノベーション、[5]静岡大・グリーン科学技術、[6]立命館大院・生命科学)

○Takunari Kono[1,2], Mehrotra Sandhya[3], Chikako Endo[2], Mami Matsuda[4], Hiroyuki Kimura[5], Tomohisa Hasunuma[4], Akiho Yokota[2], Hiroyoshi Matsumura[6], Hiroki Ashida[1] ([1]Kobe Univ. Grad. Sch. of Human Development and Environment, [2]Grad. Sch. of Biological Sciences, NAIST, [3]BITS Pilani, [4]Kobe Univ. Grad. Sch. of Science, Technology and Innovation, [5]Shizuoka Univ. Research Institute of Green Science and Technology, [6]Ritsumeikan Univ. Grad. Sch. of Life Sciences)

【背景・目的】我々は、光合成生物の利用するカルビンサイクルが生物の進化上、どのようにして誕生したのか、またその進化的原点は何だったのかを明らかにする目的で研究を行ってきた。その過程で、非光合成生物であるアーキアの一部が、カルビンサイクルの２つの鍵酵素、$CO_2$ 固定酵素である ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) と、RuBisCO の基質である ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP)を合成する phosphoribulokinase (PRK)を有することを明らかにした。これらアーキアはカルビンサイクルを構成する酵素の内、fructose-6-phosphate (F6P)から ribulose-5-phosphate (Ru5P)への反応ステップを触媒する酵素遺伝子を欠いている。そのためアーキアにおいて RuBisCO と PRK は、カルビンサイクルの一部と F6P を Ru5P へ変換するアーキア特異的な ribulose monophosphate 経路が融合した新規炭素代謝経路、“Reductive hexulose phosphate (RHP) 経路”で機能していることを提唱し、本会でも報告してきた。RHP 経路は、光合成カルビンサイクルと同じように RuBP を再生する代謝サイクルとして機能していると予想された。今回は RHP 経路が実際にアーキアの生体内で機能しているのか、またアーキアにおける RHP 経路の機能的役割を解析した。

【結果・考察】メタン菌 *Methanospirillum hungatei* を研究対象とし、培地に $NaH^{13}CO_3$ を添加することで代謝産物の $^{13}C$ 標識を行い、代謝産物への $^{13}C$ 取り込みの時間変化を追跡するメタボローム解析を行った。その結果、標識時間の経過に伴って $^{13}C$ が取り込まれた RHP 経路の各中間代謝産物の比率が増加した。特に、RuBisCO の $CO_2$ 固定反応によって生成する 3-phosphoglycerate (3-PGA)への $^{13}C$ 標識率が高かったことから、*M. hungatei* において RuBisCO の触媒反応が主要な $CO_2$ 固定ステップであることが明らかになった。さらに解糖系及び糖新生の中間代謝産物にも $^{13}C$ 取り込みが観察され、RuBisCO によって固定された炭素の大部分が、glucose-6-phosphate を経由して糖新生へ、また phosphoenolpyruvate を経由して解糖系へ供給されていることが分かった。また、低い標識率であったが、明らかな Ru5P への $^{13}C$ 取り込みが観察されたことから、*M. hungatei* において RHP 経路が機能していることが示唆された。RHP 経路と光合成カルビンサイクルは数ステップのみが異なっていること、またメタン菌の進化的位置から、この RHP 経路が光合成カルビンサイクルの進化的原型であると考えられる。このように、我々は光合成カルビンサイクルの祖先経路をアーキアに見出し、光合成システムの基盤がアーキアで構築されていたことを明らかにした。

Archaea, Calvin cycle, RuBisCO

講演番号：4J31a06
講演日時：3 月 20 日 10:35～ J 校舎 31 会場

オーストラリアシャジクモにおける単一細胞内代謝物動態解析
Metabolite dynamics in a single cell of Chara australis
○奥田 安美[1]、寺嶋 傑[1]、佐々木 亮介[2]、三村 徹郎[3]、斉藤 和季[2,4]、及川 彰[1,2]（[1]山形大農、[2]理研 CSRS、[3]神戸大院理、[4]千葉大院薬）
○Ami OKUDA[1], Suguru TERASHIMA[1], Ryosuke SASAKI[2], Tetsuro MIMURA[3], Kazuki SAITO[2,4], Akira OIKAWA[1,2] ([1]Yamagata Univ., [2]RIKEN CSRS, [3]Kobe Univ., [4]Chiba Univ.)

【目的】細胞内における代謝物動態は、酵素やトランスポーター、受容体等のタンパク質の局在情報から推定されており、直接確認された研究例は少ない。密度勾配遠心分離法によりオルガネラを単離し、それらに含まれる代謝物を調べた例もあるが、それらは多細胞由来であり、一細胞内における代謝物動態は確認されていない。我々は以前、巨大な単一節間細胞を持つオーストラリアシャジクモ（*Chara australis*）から液胞などを分画し、それぞれの画分に含まれる代謝物をメタボローム解析によって網羅的に調べ、単一細胞内における代謝物の局在を明らかにした。本研究では、同様にオーストラリアシャジクモ節間細胞から単離した各オルガネラにおける $^{13}C$ 標識された代謝物を経時的に追跡することによって、単一細胞内における代謝物の動態を明らかにすることを試みた。
【方法および結果】$^{13}C$ を投与した節間細胞から、液胞、葉緑体、細胞質のそれぞれの画分を経時的に採取し、CE-MS（キャピラリー電気泳動質量分析装置）を用いたメタボローム解析に供した。その結果、細胞内に取り込まれ $^{13}C$ 標識された一部の代謝物が、素早く液胞に移動・蓄積することが確認された。また、一定時間 $^{13}C$ 投与した節間細胞を通常の培養液に移したところ、$^{13}C$ 標識され液胞内に蓄積していたいくつかの代謝物含量で経時的な減少が認められた。これは、代謝物が液胞外へ移動したか、液胞内で代謝されたことを示唆している。一方で、光合成阻害剤を $^{13}C$ と同時に節間細胞に投与すると、$^{13}C$ の細胞内代謝物への標識が抑えられた。これは $^{13}C$ の細胞内への取り込みが光合成に依存していることを示している。次に光条件が細胞内での代謝物動態に影響を与えることが考えられたため、様々な光条件下の各画分に含まれる $^{13}C$ 標識代謝物含量を経時的に調べた。$^{13}C$ を明条件または暗条件下で投与した時、アミノ酸の一部は明条件で液胞内に積極的に蓄積される一方で、暗条件下ではあまり取り込まれなかった。また、$^{13}C$ 投与した節間細胞を通常の培養液に移し、明条件下または暗条件下で一定時間静置させた結果、明条件下では $^{13}C$ 標識され液胞内に蓄積していたアミノ酸の一部が減少し、標識されていない代謝物の蓄積量が増加していた。一方で、暗条件下では液胞内に蓄積していた代謝物量の変動は認められなかった。これらの結果から、液胞膜に存在するアミノ酸トランスポーターが、光シグナルを受容し、代謝物のオルガネラ間移動の制御に関与しているという可能性が推測された。また、オーストラリアシャジクモの節間細胞内における代謝や生成される代謝物の液胞内への輸送は、代謝物毎に異なる機構を持って制御されていることが示唆された。

metabolome, single cell, *Chara australis*

発表責任者：及川彰（oikawa@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp）

講演番号：4J31a07
講演日時：3 月 20 日 11:00～ J 校舎 31 会場

シロイヌナズナ液胞タンパク質受容体の輸送モチーフの変異による液胞タンパク質輸送の影響
Analysis on the effect of mutation of trafficking motif of vacuolar-sorting receptor on sorting of vacuolar proteins in *Arabidopsis thaliana*

○高畑 周平[1]、松波 絵里香[1]、清水 英寿[2]、地阪 光生[2]、横田 一成[2]、中川 強[1]、西村 浩二[1]([1]島根大・総科セ・遺伝子、[2]島根大・生物資源)
○Shuhei Kohata[1], Erika Matsunami[1], Hidehisa Shimizu[2], Mitsuo Jisaka[2], Kazushige Yokota[2], Tsuyoshi Nakagawa[1], Koji Nishimura[1] ([1]Inter. Cent. Sci. Res., Shimane Univ., [2]Fac. Life Env. Sci., Shimane Univ.)

クラスリン被覆小胞（CCV）は、真核生物におけるトランスゴルジ網（TGN）や細胞膜（PM）の膜タンパク質、いわゆる積荷タンパク質を種々のエンドソームに輸送する役割をもつ。CCVの被覆タンパク質はクラスリントリスケリオンとアダプタータンパク質AP複合体からなり、それは5つのサブタイプがあり、それぞれ特有のタンパク質の輸送経路を担っている。AP複合体は、CCVで運ばれる積荷タンパク質に存在する積荷認識配列（CRS）に結合して、積荷タンパク質を特異的に選抜する機能をもつことが広く知られている。植物の液胞貯蔵タンパク質（VSP）は特異的な受容体により小胞体から液胞へ輸送されるが、その受容体の１つに、一回膜貫通型タンパク質である液胞選別受容体VSRがある。VSRは小胞体内腔にあるVSPを認識し、その複合体ごと、膜小胞輸送により、VSPを液胞へ運ぶ。VSRの細胞質尾部CTには、CRSとしてチロシンモチーフ（YXXΦ、Xは任意のアミノ酸、Φは疎水性アミノ酸）と酸性ジロイシン様モチーフ（D/EXXXL（I/M/L））が保存されている。VSRによって後期エンドソーム（LE）、さらに液胞へと輸送されるVSPとしてシロイヌナズナアリューレイン様タンパク質（AALP）が知られている。VSPのファミリーでは、VSPのN末端付近にあるNPIRはVSRに対するCRSとして機能しており、AALPにも同様に保存されている。本研究では、植物のCCVによる膜小胞輸送経路におけるCRSの役割を解明するために、液胞選別受容体VSRのCRS変異体の細胞内局在とその相互作用因子を調べた。その結果、VSR中にある、CCV輸送のCRSであるチロシンモチーフがVSRを介するVSPの輸送に重要である事が示唆された。さらに、VSRの各CRS変異体とAALPの相互作用解析により、チロシンモチーフ変異体VSRの過剰発現の場合、AALPが液胞への輸送に影響が及ぼされる事が示唆された。本研究では、AP複合体によるVSRの認識またはVSRによるAALPの認識に対する特異性とVSRの輸送経路におけるCRSの役割について議論する。

BiFC, arabidopsis, membrane trafficking

発表責任者：西村浩二（knishimu@life.shimane-u.ac.jp）

講演番号：4J31a08
講演日時：3 月 20 日 11:15～ J 校舎 31 会場

シロイヌナズナ PAMP 受容体の膜輸送小胞への選別機構に関する研究
Analysis on molecular mechanism for sorting of PAMP receptor into membrane transport vesicles in *Arabidopsis thaliana*

○塚本 真嗣[1]、常 愛花[2]、清水 英寿[2]、地阪 光生[2]、横田 一成[2]、中川 強[1]、西村 浩二[1]([1]島根大・総科セ・遺伝子、[2]島根大・生物資源)
○Masashi Tsukamoto[1], Aika Tsune[2], Hidehisa Shimizu[2], Mitsuo Jisaka[2], Kazushige Yokota[2], Tsuyoshi Nakagawa[1], Kohji Nishimura[1] ([1]Inter. Cent. Sci. Res., Shimane Univ., [2]Fac. Life Env. Sci., Shimane Univ.)

シロイヌナズナキチン受容体（CERK1）は、病原体関連分子パターン(pathogen-associated molecular pattern、PAMP）誘導免疫に必須の膜貫通型パターン認識受容体（Pattern-recognition receptor、PRR）である。細胞膜において真菌の細胞壁に由来するキチンオリゴマーを認識すると、自身の細胞内キナーゼドメインによる自己リン酸化を経て、MAPK カスケードを活性化し植物免疫を誘導する。植物病原微生物の鞭毛タンパク質 flagellin は PAMP であり、その受容体である FLS2 は flagellin を認識すると、MAPK カスケードの活性化により植物免疫を誘導する。さらに、FLS2 はエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、これは情報伝達のダウンレギュレーションと考えられている。一方、CERK1 に関しては、演者らの研究グループがそのエンドサイトーシスについて、これまでに本大会で報告している。クラスリンは近年植物のエンドサイトーシスの主要な実行分子であることが報告されている。本研究では、CERK1 のクラスリンエンドサイトーシスに焦点を当て、CERK1 の膜輸送小胞への選別機構解析を試みた。クラスリン被覆小胞（CCV）はクラスリントリスケリオンと AP 複合体の 2 種類の被覆タンパク質複合体からなり、5 種類の AP 複合体が複数のクラスリン輸送経路を分担する。そのうち AP2 は、植物のエンドサイトーシスに関わることが報告されている。AP2 は 4 つのサブユニット（α / β / μ / σ）から構成されるヘテロ四量体であり、それらが積荷タンパク質のチロシンモチーフ(YxxΦ、x は任意のアミノ酸、Φは疎水性アミノ酸)や酸性ジロイシンモチーフ（[D/E]xxxL[I/L]）などの積荷認識配列（CRS）を認識し結合することにより CCV は形成されるが、植物の積荷タンパク質の選別機構については十分に理解されていない。そこで本研究では、AtCERK1 の CRS としての役割を担うと予想されるモチーフと AP2 との相互作用解析を試みた。その結果、AP2 のμサブユニット（AP2M）やσサブユニットは、複数のチロシンモチーフや酸性ジロイシン様モチーフと相互作用することが示唆された。本大会では、上記モチーフの異生物種間との保存性や、μAd, σAd の CRS 認識における共通点についても報告したい。

BiFC, arabidopsis, membrane trafficking

発表責任者：西村 浩二（knishimu@life.shimane-u.ac.jp）

講演番号：4J31a09
講演日時：3 月 20 日 11:30～ J 校舎 31 会場

シロイヌナズナブラシノステロイド受容体 AtBRI1 とクラスリン AP2 複合体との相互作用解析
Analysis on interaction between Brassinosteroid receptor BRI1 and Clathrin-AP2 complex in *Arabidopsis thaliana*

○吉田 昇平[1]、清水 英寿[2]、地阪 光生[2]、横田 一成[2]、中川 強[1]、西村 浩二[1]([1]島根大・総科セ・遺伝子、[2]島根大・生物資源)
○ Shohei YOSHIDA[1], Hidehisa Shimizu[2], Mitsuo Jisaka[2], Kazushige Yokota[2], Tsuyoshi Nakagawa[1], Kohji Nishimura[1] ([1]Inter. Cent. Sci. Res., Shimane Univ., [2]Fac. Life Env. Sci., Shimane Univ.)

植物ホルモン受容体は細胞外のホルモンシグナルを受容し、細胞内へ情報を伝達する情報伝達因子である。ブラシノステロイドは、光形態形成を含む植物の分化・成長を調節する植物ホルモンである。その受容体である BRI1（Brassinosteroid-insensitive 1）は細胞膜受容体であり、細胞外領域でブラシノステロイドを受容し、細胞質領域のキナーゼを介して細胞内情報伝達経路を活性化させる。また BRI1 はブラシノステロイドを受容すると、情報伝達経路を活性化させる一方で、エンドサイトーシスされて、細胞内に取り込まれることが知られている。BRI1 がブラシノステロイドに応答してエンドサイトーシスすることの生理的意義としては、エンドサイトーシスにより細胞膜上の分子の数を低下させることにより情報伝達を負に制御すること、と考えられている。
植物タンパク質の被覆小胞輸送経路には、分泌経路、液胞経路、エンドサイトーシス経路などが存在し、被覆小胞によりタンパク質の輸送がなされている。クラスリン被覆小胞（Clathrin-coated vesicle、CCV）はトランスゴルジ網からの液胞輸送経路や細胞膜からのエンドサイトーシス経路を担う被覆小胞であり、クラスリントリスケリオンと AP（adaptor protein）複合体から構成される。AP 複合体は AP1～5 の 5 種類が知られ、各 AP は二つの大サブユニット、一つずつの中および小サブユニットから構成され、AP 複合体サブユニットの μ あるいは σ アダプチンなどにより CCV で輸送されるタンパク質（積荷タンパク質）を特異的に選抜する。5 種類の AP は輸送経路を分担しており、モデル植物のシロイヌナズナでは、哺乳動物と同様に AP2 がエンドサイトーシス経路で機能することが報告されている。しかし AP 複合体と CCV で輸送される積荷タンパク質との認識機構については不明なことが多い。本研究では、BRI1 のクラスリンエンドサイトーシス輸送機構の解明のために、AP2 の μ サブユニット（AP2M）あるいは σ アダプチン（AP2S）と BRI1 との相互作用を BiFC 法により解析し、BRI1 の積荷選抜機構に関する新たな知見を得ることを目的とした。
BiFC 解析の結果、AtBRI1 は AP2μ2 および AP2σ2 と相互作用し、さらに AtBRI1 の細胞質尾部に存在する積荷認識配列(cargo recognition seaquence、CRS)が特異的に認識されることを示唆するデータを得た。この発表では、AP 複合体による AtBRI1 の選抜機構について議論する。

BiFC, arabidopsis, membrane trafficking

発表責任者：西村　浩二（knishimu@life.shimane-u.ac.jp）

講演番号：4J31a10
講演日時：3 月 20 日 11:45～ J 校舎 31 会場

# 微生物資材の植物への作用機作の研究

# Study on the effect of microbial materials on plants.

○西片 百合[1]、荒城 新[1]、松崎 雅広[2]、安保 充[1] ([1]明大農、[2]鈴峯女子短期大学保育学科)
○Yuri NISHIKATA[1], Shin ARAKI[1], Masahiro MATSUZAKI[2], Mitsuru ABO[1] ([1]Meiji Univ., [2]Suzugamine Women's college.)

【背景・目的】

微生物資材とは、主に有用微生物とその活性をもたらす成分から成る資材で、土壌に施用し、最終的に植物体へ含有微生物の活性による効果を示す資材のことである。農業現場では、増収、品質向上といった効果の報告がされている。本研究では、微生物資材の効果を植物体への作用機作の観点から解明することを目的とし、具体的にはバイオアッセイ系を確立後、生育促進効果として増収効果および無機成分吸収促進効果の 2 点について実験を行った。

【方法】

微生物資材として紅色非硫黄細菌を主体とする光合成細菌特殊肥料であるバクテリアン（ワタナベ産業）を用いた。作物のモデルとしてチシャ（タキイ種苗、グリーンウエーブ）を用いた。

生育は、人工気象器内で温度 20℃、湿度 60%に設定し、MS 寒天培地で 14 日間生育後、サンプリングした。生育条件として Control（資材なし)、B（微生物資材)、BF（B から 0.20 μm フィルターにより菌体を除いた液）の 3 条件を設定し、増収効果では地上部、根の湿重量により評価を行い、無機成分吸収促進効果では地上部の無機成分($^{24}$Mg, $^{55}$Mn, $^{56}$Fe, $^{63}$Cu, $^{98}$Mo)を ICP-MS(Perkin Elmer, NexION® 300D)の分析によって評価した。

【結果】

バイオアッセイ系は、貧栄養条件下(1/10MS 培地)、バクテリアンを 1,000 倍希釈添加、照度約 8,500 lux の条件で、増収効果、無機成分吸収促進効果が確認されたことから、確立できたと判断した。

増収効果については、微生物資材の施用により、地上部湿重量の増加が有意差（$^{**}p<0.01$)、再現性を持って示された。これは、菌体を除いた BF 条件でも同様の増加が示された。また、根においても同様に、微生物資材（B、BF 液）の施用により有意に湿重量増加が示された（$^{**}p<0.01$)。

無機成分吸収促進効果については、微生物資材の施用により、Control と比較して B、BF 条件ともに、地上部中の Mg, Fe 量が減少し、Mn, Mo 量が増加を示した。Cu は、結果に十分な再現性が得られなかった。中でも Mo が顕著に増加することが再現性良く示された。B だけでなく BF においても効果を示すことから、増収及び無機吸収の促進効果を示す画分は、微生物自体の活性や微生物に含まれる成分ではなく、微生物存在下での細胞外成分であることが示された。現在、Mo の取込みを指標にその作用機作の解明を行っている。

microbial materials, essential micro-element uptake

発表責任者：安保充（abo@meiji.ac.jp）

講演番号：4J31a11
講演日時：3 月 20 日 12:00～ J 校舎 31 会場

# コウキクサ細胞壁に含まれるホウ素結合多糖に関する研究

# Analysis of boron-binding polysaccharides in duckweed cell walls

○中野 耕太[1]、桑木 信輔[1]、小林 優[1]、間藤 徹[1]、伊藤 照悟[2]、小山 時隆[2] ([1]京大農、[2]京大理)
○Kota NAKANO[1], Shinsuke KUWAKI[1], Masaru KOBAYASHI[1], Toru MATOH[1], Shogo ITO[2], Tokitaka OYAMA[2] ([1]Kyoto Univ. Agriculture, [2]Kyoto Univ. Science)

【背景・目的】

維管束植物の微量必須元素であるホウ素はアポプラストに局在し、遊離の無機ホウ酸、あるいは細胞壁ペクチンのラムノガラクツロナン II (RG-II) 領域に結合した B-RG-II 複合体として存在している。

ホウ素の体内含量および要求量は種間差が大きい。一般的な維管束植物のホウ素含量は乾燥重あたり 2～95 ppm であるのに対し、コウキクサ (*Lemna minor* L.) のホウ素含量は 200～800 ppm に達する。この高いホウ素含量は、無機ホウ酸や B-RG-II だけでは説明できない。その存在形態を同定し性質や機能を明らかにすることは、植物のホウ素栄養生理に関する新規な知見を提供し、ホウ素の生理機能のよりよい理解につながる。そこで本研究では、コウキクサ細胞壁におけるホウ素の存在形態について検討した。

【方法・結果】

培地ホウ素濃度 30 μM で生育させたコウキクサの細胞壁には、一般的な維管束植物の 20 倍以上にあたる約 800 ppm のホウ素が含まれていたが、RG-II 含量は一般的な植物と同程度であった。また培地ホウ素濃度を高めると細胞壁ホウ素含量も上昇したが、RG-II 含量はほとんど変化しなかった。このことから、コウキクサ細胞壁には RG-II 以外のホウ素結合物質が存在すると考えた。

コウキクサ細胞壁を希塩酸で抽出すると無機ホウ酸が遊離し、同時に酸性多糖が溶出した。この多糖を透析した後にホウ酸と混合すると、多糖はホウ酸と結合してゲル化し沈殿した。従ってこの多糖がコウキクサ細胞壁に含まれるホウ素結合物質であると考え、その単離、精製を試みた。沈殿した多糖を再度希塩酸に溶解させ、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過クロマトグラフィーで分画したところ、ホウ酸とエステル結合しやすいアピオースを含む多糖アピオキシラン（AX）およびアピオガラクツロナン（AG）が得られた。単離された AG および AX は、いずれもホウ酸を添加することでゲル化した。これらの結果から、コウキクサ細胞壁においてホウ素は AG および AX のアピオース残基にエステル結合し多糖ゲルを形成していると推定した。

アピオースの合成を阻害すると、この糖を主要成分とする AX および AG の合成も抑制されると考えられる。そのような変異株は、AX および AG とホウ酸が形成する多糖ゲルの生理機能解析に有用である。そこで現在、UDP-アピオース合成酵素を RNAi 法で発現抑制した形質転換コウキクサの作成を進めている。

cell wall, boron, *Lemna minor*

講演番号：4J31a12
講演日時：3 月 20 日 12:15～ J 校舎 31 会場

シロイヌナズナにおけるホウ素欠乏初期応答の解析
Analysis of early responses to boron deprivation in Arabidopsis plants
宮本 真亜子[1]、○小林 優[1]、間藤 徹[1]、北島 佐紀人[2]、花野 滋[3]、イ ニョマン スメルタ[4]、櫻井 望[3]、柴田 大輔[3] ([1]京大農、[2]京都工繊大工芸科学、[3]かずさ DNA 研、[4]インドネシア科学院)
Maako MIYAMOTO[1], ○Masaru KOBAYASHI[1], Toru Matoh[1], Sakihito KITAJIMA[2], Shigeru HANANO[3], Sumerta I Nyoman[4], Nozomu SAKURAI[3], Daisuke SHIBATA[3] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Inst. of Tech., [3]Kazusa DNA Res. Inst., [4]Indonesian Inst. of Sci.)

植物の必須元素ホウ素は細胞壁に局在し、ペクチンをホウ酸ジエステル結合で架橋しゲル化させる役割を果たしている。シロイヌナズナの培地からホウ素を除去すると、1 時間以内にストレス応答遺伝子の発現上昇や根の伸長領域における細胞死が発生する。ホウ素がペクチンのゲル化に必要な因子であることを考えれば、これら迅速な応答や傷害はペクチンの架橋不全による細胞壁の構造不安定化が原因で生じると推定される。しかしその具体的なメカニズムは不明である。そこで本研究では、シロイヌナズナの B 欠乏初期応答に対する各種薬剤の効果を検討することで、B 欠乏ストレスシグナルの伝達機構や、急速な細胞死が発生する理由を解明しようと考えた。
活性酸素スカベンジャーである tetramethylpiperidine、NADPH オキシダーゼ阻害剤である diphenyleneiodonium が根伸長領域の細胞死を軽減したことから、B 欠乏初期応答には活性酸素分子種の生成蓄積が関与していると考えた。またソルビトール添加により培地浸透圧を高め、吸水を抑制した場合も細胞死は軽減されたことから、ペクチンの架橋不全で不安定化した細胞壁が膨圧に対抗できず、細胞膜が局所的に伸展・変形することが欠乏応答の引き金となっている可能性が考えられた。更に、欠除処理に伴って一酸化窒素が生成することも見出した。またホウ素欠除処理時の遺伝子発現変化を RNA シークエンシングで網羅的に解析したところ、病原菌感染時に誘導される変化との類似度が高かった。このことから、ホウ素欠乏による細胞壁の構造不安定化が、ペクチンの分解を伴う病原菌感染と共通の事象として認識され、一連の応答を引き起こしている可能性が示唆された。

boron, deficiency, *Arabidopsis thaliana*

発表責任者：小林優（kobayashi.masaru.8e@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4J32a01
講演日時：3 月 20 日 09:20～ J 校舎 32 会場

# 高温登熟乳白部位特異的プロテオーム解析

# Proteomic Analysis of Rice Chalky Grains Under High-temperature Conditions in Field System

○金古 堅太郎[1]、佐々木 麻衣子[1]、佐藤 友紀[2]、椎名 将平[2]、三ツ井 敏明[1,2]（[1]新潟大院・自然科学、[2]新潟大・農）
○Kentaro Kaneko[1], Maiko Sasaki[1], Yuuki Sato[2], Syouhei Shiina[2], Toshiaki Mitsui[1,2] ([1]Grad. Sch. & tech., Niigata Univ, [2]Dept. Applied Biol. Chem., Niigata Univ)

通常食用米の玄米は、透明で艶がある。しかし、登熟期間中に高温に曝されると外観品質の低下、特に米が白濁化する高温登熟乳白が発生する。高温登熟乳白は、米の等級・商品価値を低下させ、生産者の収入減少、さらには産地のブランドイメージを壊すことになりかねない。米どころ新潟県では 2010 年に記録的な高温年となり新潟県産米の等級が著しく減少した。

我々は、 高温登熟被害の著しかった 2010 年の新潟県内の水田圃場で収穫された玄米から、高温登熟乳白部位のみを削りだし、コメの乳白部位特異的プロテオーム解析を行った。高温登熟乳白部位では、デンプン代謝関係、活性酸素種消去系酵素・ヒートショックプロテインといったストレス応答関係のタンパク質の発現に変動が見られた。特にストレス関連タンパク質のうち低分子量のヒートショックプロテインと乾燥ストレスに関連する LEA（Late Embryo Abundance）プロテインが高温登熟乳白部位での蓄積していた。デンプン代謝関係は、GBSSI（デンプン顆粒結合型デンプン合成酵素 I）が減少していた。一方でデンプン分解酵素であるα-アミラーゼ 3E の発現上昇が高温登熟乳白部位でみられた。さらに走査型電子顕微鏡観察によって高温登熟乳白部位ではクレーター状の小穴が観察された。このため、これらの高温登熟乳白部位で見られたレーター状の小穴はα-アミラーゼよる作用であることが示唆された。また、デンプン鎖長構造解析の結果は、高温登熟乳白部位と透明部位ではその構造には差異が認められなかった。一方、透明部位と比べ、高温登熟乳白部位ではスクロース、グルコース量が増加していた。

starch, proteomics, iTRAQ

講演番号：4J32a02
講演日時：3 月 20 日 09:35～ J 校舎 32 会場

# 酒米における白濁化メカニズムの解明：走査型電子顕微鏡による解析

# Study on Grain Chalking Mechanism of Sake-brewing Rice: Scanning Electron Microscopic Analysis

○椎名 将平[1]、栗林 なな子[2]、金古 堅太郎[2]、三ツ井 敏明[1,2] ([1]新潟大農・応生化、[2]新潟大院・自然科学)

○Shohei SHIINA[1], Nanako KURIBAYASHI[2], Kentaro KANEKO[2], Toshiaki MITSUI[1,2] ([1]Dept. Applied Biol. Chem., Niigata Univ., [2]Grad. Sch. Sci. & Tech., Niigata Univ.)

イネの登熟期間中での高温ストレスは玄米外観品質の低下をもたらす。その一つが高温登熟乳白の発生である。玄米外観品質の低下は生産者の収入減、長期的には産地のブランドイメージを壊すことにもなりかねない。そのため高温登熟乳白の発生を抑制することが望まれている。一方で、酒造好適米、いわゆる酒米には米粒の中心に白濁化した心白部位が存在する。この心白部位は通常温度で発生し、清酒造りに適した望まれる形質とされているが、栽培環境や品種によって発現率が変化することが知られている。本研究では、越淡麗、五百万石、山田錦の三品種に対し登熟期に高温ストレスを与え、高温登熟乳白と通常温度条件下で生育した酒米心白の生化学的比較解析を行い、白濁化メカニズムの解明を目指している。

登熟期における高温ストレスの酒米心白発現に与える影響を調べるため、9 サンプル(三品種×平温、準高温、高温条件)を用いて縦断面の心白標準画像を作成し、心白発現パターンを比較した。縦断面での酒米心白は背側と腹側に分かれているが、平温条件下では背側心白の発現頻度が高く、準高温ストレスによって腹側心白の発現頻度が増加し、高温ストレスでは背側、腹側に加え背白も増えた。より詳細なデンプン顆粒の観察を行うため、走査型電子顕微鏡による解析を行った。白濁化した米では胚乳細胞に集積したデンプン顆粒間に生じた空隙で光が乱反射するため白く濁って見える。通常温度条件下で生育した酒米心白部位のデンプン顆粒は比較的大きさや形の揃った球状をしていたのに対し、高温ストレスを与えた酒米では上記に加え、心白部位以外のデンプン顆粒において高温登熟乳白の影響と思われる、小さなクレーター状の穴の空いたデンプン顆粒が観察された。さらに、温度条件による酒米白濁化部位のプロテオームの変化についても報告する。

Grain Chalking, high temperature, Sake-brewing rice

講演番号：4J32a03
講演日時：3 月 20 日 09:50～ J 校舎 32 会場

スサビノリ葉状体の脱水耐性関連候補タンパク質群の同定

Identification of desiccation tolerance-related candidate proteins from the thalli of *Pyropia yezoensis*

○山口 健一[1,2]、久留 崇寛[1,3]、尾島 佑[1]、脇山 貴文[1]、島 祐理[1]、山岡 拓也[1]、山倉 那央[1,2]、三輪 泰彦[4]、桑野 和可[1,2]、小田 達也[1,2] ([1]長大水、[2]長大院水環、[3]長総大付属、[4]福山大生命工)

○Kenichi YAMAGUCHI[1,2], Takahiro KUDOME[1,3], Tasuku OJIMA[1], Takafumi WAKIYAMA[1], Yuri SHIMA[1], Takuya YAMAOKA[1], Nao YAMAKURA[1,2], Yasuhiko MIWA[4], Kazuyoshi KUWANO[1,2], Tatsuya ODA[1,2] ([1]Fac. Fish. Nagasaki Univ., [2]Grad. Sch. Fish. Sci. Environ. Stud. Nagasaki Univ., [3]High Sch. Attach. Nagasaki Inst. Appl. Sci., [4]Fac. Life Sci. Biotech. Fukuyama Univ.)

【目的】紅藻アマノリ属スサビノリ(*Pyropia yezoensis*)の葉状体は、脱水に対して強い抵抗性をもつが、その分子機構は未解明である。同属の *P. orbicularis* では、乾燥下でのフィコビリタンパク質、シャペロンタンパク質、抗酸化酵素などの顕著な発現上昇が脱水耐性に寄与するとの報告があるが、スサビノリではそのような発現変動は観察されない。本研究では、本種葉状体の熱可溶性画分が *in vitro* の脱水変性保護作用をもち、LEA 様タンパク質を主要タンパク質として含むことを見出したので報告する。

【方法】材料として、有明産支柱式養殖ノリを用い、非干出（非乾燥）の対照に培養株 TU-1 を用いた。熱水抽出（90℃, 1 h）後、塩化セチルピリジニウム処理により粘性多糖を除去し、熱可溶性(Heat-soluble: HES)画分を得た。乾燥変性保護試験は、HES 画分またはウシ血清アルブミン(BSA)存在下での乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)の乾燥失活抑制を測定した。HES タンパク質の同定は、SDS-PAGE/2DE 分離後、ゲル内消化物の MS/MS 解析により行った。

【結果】HES 画分は、LDH に対して BSA と同等の乾燥変性保護活性を示した。HES 画分の主要タンパク質として、グループ 3 LEA に低い配列相同性を示す LEA 様タンパク質 2 種(HES1, HES3), 新規 LEA 様タンパク質(HES2),天然変性タンパク質(CP12, PYP1), 翻訳関連タンパク質（PRPL12, RRF）を同定できた。

desiccation, LEA, *Pyropia yezoensis*

発表責任者：山口健一（kenichi@nagasaki-u.ac.jp）

講演番号：4J32a04
講演日時：3 月 20 日 10:05～ J 校舎 32 会場

# 冠水ストレス応答性転写因子 AP2ERF(VII)-1 を導入したダイズの作製と冠水耐性の評価

Evaluation of soybeans transformed with AP2ERF(VII)-1 transcription factor for submergence tolerance at the emergence stage.

○西澤 けいと、小松 節子（農研機構・次世代作物開発研究センター）
○Keito Nishizawa, Setsuko Komatsu (Institute of Crop Science, NARO)

【背景と目的】 播種後の大雨等により冠水下に置かれた出芽期のダイズでは、幼根の損傷や子葉の腐敗といった様々な障害（湿害）が発生する。我々は、冠水耐性ダイズの作出に向けて、冠水ストレス応答機構の分子生物学的解析等を行っているが、冠水ストレス応答の制御機構や耐湿性向上に寄与する重要な候補遺伝子の解明には至っていない。これまでに、冠水耐性を示すインド型イネ(FR13A)由来の冠水耐性遺伝子 *Sub1A* を発現する形質転換ダイズを作製し、出芽期における冠水耐性を評価したが、冠水耐性の向上は認められなかった（2015 年度大会)。一方、シロイヌナズナにおいては、Sub1A と同族の内在性 AP2ERF(VII)転写因子を過剰発現する形質転換体は低酸素ストレスや冠水ストレスに耐性を示すことが報告されている。そこで本研究では、ダイズ内在性 AP2ERF(VII)転写因子のうち、冠水ストレス応答性のものの一つを導入した形質転換ダイズを作製し、出芽期の冠水耐性を評価した。

【方法および結果】カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターと連結したダイズ内在性 *AP2ERF(VII)-1* の cDNA を、アグロバクテリウム法によりダイズ（スズユタカ）に導入し、少なくとも 3 系統の独立した形質転換系統を得た。後代の葉を用いた qRT-PCR の結果、いずれの系統においても *AP2ERF(VII)-1* の過剰発現が確認された。これらの系統の種子を播種し、播種 2 日後から 6~7 日間の冠水処理を行い、5～6 日間の回復期の後に障害の程度を調査したところ、非形質転換体と同程度の障害を受けていた。このことから、*AP2ERF(VII)-1* は出芽期のダイズに冠水耐性を付与しないと考えられる。

soybean, submergence, transcription factor

講演番号：4J32a05
講演日時：3 月 20 日 10:20～ J 校舎 32 会場

収穫時の環境条件がダダチャマメの代謝成分に与える影響
Effects of environmental conditions at harvest on metabolite amounts in edamame
○堀部 大和[1]、竹内 勝隆[1]、森田 渓[1]、清水 康貴[1]、佐々木 亮介[2]、斉藤 和季[2,3]、及川 彰[1,2] ([1]山形大農、[2]理研 CSRS、[3]千葉大院薬)
○Yamato HORIBE[1], Katsutaka TAKEUCHI[1], Kei MORITA[1], Yasutaka SHIMIZU[1], Ryosuke SASAKI[2], Kazuki SAITO[2,3], Akira OIKAWA[1,2] ([1]Yamagata Univ., [2]Riken CSRS, [3]Chiba Univ.)

【目的】エダマメとは、ダイズ（*Glycine max* (L.) Merr)の未成熟種子のことであり、日本では古来より食材として利用されている。またエダマメは豊富なタンパク質に加え、GABA やビタミン類など、機能性成分を豊富に含むことが知られており、近年の健康志向の高まりから国内外で健康食品として注目を集めている。エダマメの品質は収穫期の環境条件に影響されることが知られており、例として収穫前日の夜が低温であるとアミノ酸や糖の含量が増加するということが報告されている。しかしながら、収穫時の気温、降水量、日照時間などの環境条件がエダマメの品質に与える影響は十分に調べられていない。そこで本研究では収穫時の外部環境がエダマメの品質に与える影響についての解明を試みた。

【方法】本研究では、高い糖含量など独特の風味・香りが特徴の鶴岡市の在来エダマメ品種であるダダチャマメをサンプルとして用いた。まずダダチャマメ品種‘甘露’‘早生白山’‘白山’‘尾浦’‘雪音’を各品種の収穫適期に毎日サンプリングした。収穫日の環境条件はデータロガーなどにより連続的に計測した。次に、サンプルに含まれるアミノ酸などのイオン性化合物および中性糖などの含量を、キャピラリー電気泳動質量分析装置（CE-MS）および液体クロマトグラフィー質量分析装置（LC-MS）などを用いたメタボローム解析により網羅的に明らかにした。解析から得られた代謝物含量データと各環境条件を統合的に解析し、さらに本研究室の過去のデータと比較した。

【結果】LC-MS を用いた分析により、ダダチャマメから 4 種の中性糖（sucrose、maltose、glucose、fructose）および inositol が検出された。CE-MS による分析からは alanine、asparagine、glutamate などの呈味性アミノ酸をはじめとする 100 種以上のカチオンを検出した。アニオンの解析は現在進行中である。収穫時の環境条件との相関解析により一部のアミノ酸やポリアミン類、糖類が外部環境の影響を受けていることが示唆された。さらに、環境条件の代謝物量への影響は品種間で差があり、その中でも特に‘白山’品種において、その影響が大きいことが示された。今後は，‘白山’品種ダダチャマメに含まれる代謝物含量と環境条件との相関をより詳細に解析するとともに、収穫前の葉かきや株の抜き取りが食味に与える影響についても研究を行っていく予定である。

Metabolome, Edamame, Environmental conditions

講演番号：4J32a06
講演日時：3 月 20 日 10:35～ J 校舎 32 会場

オカボノアカアブラムシのイネ根への寄生によるアミノ酸の蓄積
Accumulation of amino acids in a root infested by aphid (*Tetraneura nigriabdominalis*)
○手林 慎一[1]、及川 彰[2]、佐々木 亮介[3]、斉藤 和季[3]、間世田 英明[4]、上手 麻希[4]、石原 亨[5] ([1]高知大農、[2]山形大農、[3]理研、[4]徳島大 STS、[5]鳥取大農)
○Shinichi Tebayashi[1], Akira Oikawa[2], Ryousuke Sasaki[3], Kazuki Saito[3], Hideaki Maseda[4], Maki Uwate[4], Atsushi Ishihara[5] ([1]Kochi Univ., [2]Yamagata Univ., [3]Riken, [4]Tokushima Univ., [5]Tottori Univ)

【目的】
オカアボノアカアブラムシ（*Rhopalosiphum rufiabdominalis*）は陸稲や小麦などイネ科作物の根に寄生する害虫として知られている。本種はバラ科木本植物を一次寄主として春に発生し、初夏に二次寄主であるイネ科植物の根部に移住し増殖する。昆虫の寄主選択においては、寄主植物の栄養成分がその昆虫種に対して栄養生理学的に充分であることが必須条件となるが、植物の根部は一般的に栄養価が低いことから、本種のイネ根部への寄主転換の意義や機構は謎である。そこで本研究ではイネ根部の代謝産物の解析を行いアブラムシにとっての栄養状態について検討した。
【方法】
播種4日後のイネの芽出しにアブラムシ有翅雌成虫を接種し、経時的にイネ根を採取し各種分析に供した。メタボローム解析のためにイネ根はメタノールで抽出し、抽出物を水とヘキサンで液-液分配後、水層を濃縮し50μLに転溶したのち15nLをAgilent G3250AA LC/MSD TOF systemを用いて分析した。また、トランスクリプトーム解析は、採取されたイネ幼根からキット(Qiagen)を用いてTotalRNAを抽出し、これを定法により増幅・ラベリングを行い、Rice(Jp)Gene ST Array Stripにハイブリダイゼーション後、Gene Atlasシステムを用いてイメージを取得し、データ解析を行った。
【結果】
メタボローム解析の結果、アニオン化合物はアブラムシ接種後に減少する傾向が、カチオン化合物は逆に増加する傾向が観察された。特にアミノ酸は寄生後 3 日目にかけて蓄積量が増大し、その後減少する傾向が確認された。アブラムシ共生細菌ブフネラが生合成できずアブラムシ由来の主要な栄養源であると考えられている Asn や Gln は 2.0-1.7 倍にも上昇しており、アブラムシにとっての栄養改善がなされていることが判明した。
このときの遺伝子発現の変動を調べるとアミノ酸の代謝に関連する遺伝子約 100 個の動態が確認でき、代謝・生合成ともに 20-30%の遺伝子発現が変動していた。この変動から個々のアミノ酸の生合成－代謝においては経路の変化やフラックス・バランスの変動が生じていることがうかがえた。特に Asn や Gln の生合成遺伝子の発現は他のアミノ酸の生合成遺伝子に対して顕著に増大しており、Asn や Gln などの選択的な蓄積に大きく寄与するものと推測された。このようにアブラムシは自身の生育に重要な Asn や Gln を選択的にイネに生合成させ利用していることが示された。

rice, aphid, amino acid

発表責任者：手林慎一（tebayasi@kochi-u.ac.jp）

講演番号：4J32a07
講演日時：3 月 20 日 11:00～ J 校舎 32 会場

ナンテン由来ヒドロキシニトリルリアーゼの精製と諸性質の解明
Purification and characterization of hydroxynitrile lyase from *Nandina domestica*
○北川 あすか[1]、金森 一馬[1]、柏木 望[1]、松井 大亮[1,2]、仙波 尚[3]、礒部 公安[1,2]、浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大工・生工研セ、[2]JST, ERATO、[3]株式会社日本触媒)
○Asuka KITAGAWA[1], Kazuma KANAMORI[1], Nozomi KASHIWAGI[1], Daisuke MATSUI[1,2], Hisashi SENBA[3], Kimiyasu ISOBE[1,2], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]ERATO, JST, [3]Nippon Shokubai)

【目的】ヒドロキシニトリルリアーゼ(HNL)は、シアン化合物をシアン化水素とアルデヒドまたはケトンに分解する反応を触媒する酵素で、逆反応は光学活性シアノヒドリンの合成に使用できる。当研究室では、医薬品や農薬の中間体として有用なシアノヒドリンを酵素で合成することを目的に、パッションフルーツ[(1)]やウメ[(2)]などの植物およびヤスデから HNL を見出してきた。今研究では、新たにナンテンの葉から HNL を精製し、その諸性質を明らかにした。
【方法】ナンテンの若葉 400 g を 10 mM リン酸緩衝液（pH 6.0）に添加してミキサーで破砕した後、遠心分離した上清液を粗酵素液とした。次に、粗酵素液を上記と同じ緩衝液中で透析し、硫安分画、DEAE-Toyopearl、Butyl-Toyopearl および GigaCapQ-Toyopearl の各カラムクロマトグラフィーで精製した。酵素活性は、ベンズアルデヒドとシアン化カリウムを基質として、生成する(*R*)-マンデロニトリル量を液体クロマトグラフィーで測定し、1 分間に 1 μmol の(*R*)-マンデロニトリルの生成を触媒する酵素量を 1 U と定義した。
【結果・考察】ナンテンの葉は、若葉で高い比活性を示し、冬期の葉では活性は著しく低下した。精製酵素の比活性は約 2,400 U/mg で植物由来 HNL の中で最も高い値であった。本酵素の分子質量は 46.5 kDa で、N 末端アミノ酸配列は ESTVKVTPMI と推定された。本酵素は、ベンズアルデヒドを基質としたときに最も高い活性を示し($K_m$ 値=13 mM)、4-メチルベンズアルデヒドでも活性を示した。また、マンデロニトリル合成反応の最適 pH は 4.0 で、分解反応の最適 pH は 6.0 付近であったので、合成は pH 4.0 付近で行うことが望ましいと考えられた。さらに、本酵素は pH4.0～8.0 付近で安定であり、pH 6.0 で 50℃、30 分間加熱しても 80%以上の活性が残存していた。しかし、マンデロニトリル合成反応の最適温度は 20℃付近であり、基質や生成物が酵素反応に影響していると考えられた。その他の諸性質についても報告する。

1) Techawaree, U. et al.: *Enzayme Microb. Technol.*, **46**, 456-465 (2010)
2) Samik, N. et al.: *Tetrahedron*, **61**, 10908-10916 (2005)

hydroxynitrile lyase, plant, cyan metabolism

講演番号：4J32a08
講演日時：3 月 20 日 11:15～ J 校舎 32 会場

# シロイヌナズナ NADH 加水分解酵素（AtNUDX6）による生物的ストレス応答制御に関与する相互作用因子の同定と機能解析

# Identification and functional analysis of an interactor of the Arabidopsis NADH pyrophosphohydrolase (AtNUDX6) involved in regulation of biotic stress responses

中川 奨也[2]、小川 貴央[3]、田部 記章[4]、田茂井 政宏[2,4]、○吉村 和也[1]、重岡 成[2,4]([1]中部大応生食栄、[2]近畿大院農バイオ、[3]島根大生資科生命工、[4]近畿大農バイオ)
Syoya NAKAGAWA[2], Takahisa OGAWA[3], Noriaki TANABE[4], Masahiro TAMOI[2,4], ○Kazuya YOSHIMURA[1], Shigeru SHIGEOKA[2,4] ([1]Dept. Food Nutr. Sci., Coll. Biosci. Biotech., Chubu Univ., [2]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kinki Univ., [3]Dept. Appl. Biosci. and Biotech., Fac. Life and Environ. Sci., Shimane Univ., [4]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ.)

NADH などのピリジンヌクレオチドは生物の主要なレドックスキャリアーであり、多岐にわたる代謝反応に関与するため、そのレベルやレドックスバランスは厳密に制御する必要がある。我々はこれまでに 28 種類存在するシロイヌナズナ Nudix hydrolase（AtNUDXs）の中で、NADH に対して加水分解活性を有する AtNUDX6 および 7 が、それぞれ NPR1 およびポリ ADP リボシル化（PAR）反応の制御を介して生物的/非生物的ストレス応答の制御に機能することを示してきた。また、AtNUDX7 は生物的ストレス応答性植物ホルモンであるサリチル酸（SA）の過剰蓄積の抑制にも機能していた。さらに、活性型および不活性型 AtNUDX6 または 7 のエストロゲン（ES）誘導型一過的発現株を用いた解析により、PAR 反応の制御には細胞内 NADH レベルが直接関与すること、一方で NPR1 依存的 SA シグナル経路および SA 蓄積量の制御にはそれぞれ AtNUDX6 および 7 タンパク質自身の存在もしくは他の因子との相互作用が関与することを明らかにした。そこで、本研究では酵母ツーハイブリッド法を用いて AtNUDX6 の相互作用因子の探索を行った。

AtNUDX6 の一過的発現に伴い SA シグナル経路関連遺伝子の発現変動が認められた ES 処理 6 時間後の一過的発現株から調製した cDNA ライブラリーを用いて酵母ツーハイブリッド法を行った。その結果、AtNUDX6 の相互作用候補因子として低分子量 GTPase タンパク質ファミリーの一つ（RGP1）を同定した。そこで、リコンビナントタンパク質を用いて *in vitro* プルダウンアッセイを行った結果、RGP1 は活性型/不活性型 AtNUDX6 のいずれとも相互作用することを確認した。さらに、黄色蛍光タンパク質（mVenus）を用いた BiFC 法によりシロイヌナズナ葉細胞内での相互作用を解析した結果、AtNUDX6 と RGP1 は細胞質で相互作用することが明らかになった。また、シロイヌナズナ野生株における *AtNUDX6* および *RGP1* の発現は、SA 処理により経時的に増加した。一方、それらの発現はそれぞれ KO-*rgp1* 株および KO-*nudx6* 株において減少していた。さらに、SA 処理後の NPR1 依存的 SA 応答性遺伝子の発現量は、野生株と比較して KO-*nudx6* 株および KO-*rgp1* 株で減少していた。以上の結果から、AtNUDX6 による NPR1 依存的 SA シグナル経路の制御には RGP1 との相互作用が関与していることが示唆された。

Nudix hydrolase, stress response, salicylic acid

講演番号：4J32a09
講演日時：3 月 20 日 11:30～ J 校舎 32 会場

シロイヌナズナ bHLH11 は鉄ホメオスタシス制御における転写制御因子として機能する
bHLH11, a member of subgroup IVb bHLH, functions as transcriptional repressor involved in modulation of iron homeostasis in *Arabidopsis*

○野志 昌弘[1]、森 大輔[2]、田部 記章[1]、田茂井 政宏[1,2]、高木 優[3,4]、重岡 成[1,2] ([1]近畿大・農・バイオ、[2]近畿大院・農・バイオ、[3]産総研・生物プロセス、[4]埼玉大・環境科学)
○ Masahiro NOSHI[1], Daisuke MORI[2], Noriaki TANABE[1], Masahiro TAMOI[1,2], Masaru OHME-TAKAGI[3,4], Shigeru SHIGEOKA[1,2] ([1]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kindai Univ., [2]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kindai Univ., [3]AIST, [4]IEST, Saitama Univ.)

活性酸素種（ROS）は生成部位および種類の違いにより異なるシグナルとして、生長/発達およびストレス応答などの植物生理の発現に重要な役割を担う。我々は葉緑体 ROS に由来する酸化的シグナルの生理作用および分子機構の解明を目的に、葉緑体チラコイド膜結合型の $H_2O_2$ 消去酵素アスコルビン酸ペルオキシダーゼ（tAPX）のエストロゲン誘導型 RNAi による発現抑制シロイヌナズナ（IS-tAPX）を作出し、同植物体を用いたマイクロアレイにより同定された葉緑体 $H_2O_2$ 応答性遺伝子（RTS）群の包括的な逆遺伝学的解析を行ってきた。これまでの RTS 遺伝子発現変異株からのストレス感受性異常株の選抜により、塩基性 helix-loop-helix（bHLH）転写因子である bHLH11 の優性抑制株（DN-bHLH11）は鉄欠乏に対する感受性が著しく増大していることが見出された。bHLH11 の生理機能は不明であったが、同因子が属するサブグループ IVb bHLH 転写因子は鉄取り込みを正に制御することが知られている。そこで bHLH11 の鉄欠乏応答における役割を明らかにすることとした。

オウンプロモーターを用いた GUS アッセイにより、bHLH11 の根における高発現が示された。また、*bHLH11* の転写レベルは、鉄欠乏下では減少し、鉄過剰条件では増大した。bHLH11 過剰発現株（OX-bHLH11）を鉄欠乏条件で生育したところ、DN-bHLH11 と同様の鉄欠乏高感受性の表現型が見られた。そこで、酵母ワンハイブリッド法を利用した転写活性能試験を行ったところ、bHLH11 に転写活性化能は認められなかった。また、転写活性化ドメイン VP16 連結型 bHLH11 の過剰発現株を作出したところ、野生株と同程度の鉄欠乏感受性を示した。次に、鉄欠乏応答の鍵因子である AT2G28160: FIT の推定プロモーター領域を用いたデュアルルシフェラーゼアッセイより、FIT 転写開始点から 400~1000 bp 上流への bHLH11 の結合が確認された。さらに、bHLH11 の bHL34・104・105 との相互作用が酵母ツーハイブリッド法により示された。以上より、bHLH11 は FIT 依存的な鉄欠乏応答を負に制御する転写抑制因子であり、その機能性は bHLH ファミリー間での複合体形成により制御される可能性が示唆された。植物ホルモンであるサリチル酸（SA）は鉄欠乏応答性遺伝子の発現を誘導することが知られている。鉄欠乏処理による葉での SA 量の増大は、bHLH11 の優性抑制および過剰発現により亢進していた。一方、DN-bHLH11 および OX-bHLH11 の鉄欠乏高感受性は根への SA 処理により緩和された。以上より、bHLH11 発現変異株での鉄欠乏応答異常は、SA ホメオスタシスの崩壊に起因する可能性が示された。さらに、*bHLH11* の発現は tAPX 抑制により誘導されていた。そこで現在、葉緑体 $H_2O_2$ の鉄欠乏応答における役割の解明を目的に IS-tAPX 株の鉄欠乏感受性を経時的に解析している。

oxidative signaling, stress response, iron homeostasis

講演番号：4J32a10
講演日時：3 月 20 日 11:45～ J 校舎 32 会場

ウリ科植物が持つ汚染物質輸送因子のストレス応答への関与
Involvement of transporting factors for persistent organic pollutants in *Cucurbita pepo* toward stress responses
○礒野 絵梨香[1]、足助 聡一郎[1]、土佐 幸雄[1]、乾 秀之[1,2] ([1]神戸大院農、[2]神戸大バイオ)
○Erika ISONO[1], Soichiro ASUKE[1], Yukio TOSA[1], Hideyuki INUI[1,2] ([1]Grad. Sch. Agric. Sci. Kobe Univ., [2]Biosignal Res. Ctr. Kobe Univ.)

〈背景〉
残留性有機汚染物質(POPs)は化学的に安定であるため環境中に残留しやすく、また高脂溶性であるため、食物連鎖を通してヒトや野生生物に高濃度に蓄積し、毒性を示す。一般的に植物は高脂溶性化合物を取り込むことができないが、ウリ科植物、特にズッキーニは吸収・蓄積することができる。我々はこれまでにメジャーラテックスライクプロテイン(MLP)がウリ科植物の体内においてPOPsの輸送に関わっていることを示した。MLP は感染時特異的タンパク質クラス 10(PR-10)ファミリーに属しており、類似した疎水性の空洞を持っている。この空洞により PR-10 はリン脂質や植物ホルモンと結合できることが報告されている。一方、非生物ストレスや病原菌の感染などで発現が誘導あるいは抑制されることが知られているものの、MLP や PR-10 の機能については不明な点が多い。本研究ではズッキーニ由来の *MLP* 遺伝子を発現させたタバコ、あるいは組換え MLP を用いて、ズッキーニ MLP の生理機能を解明することを目的とした。
〈方法〉
POPs 低蓄積ズッキーニ品種 Patty Green(PG)由来の *MLP-PG1*、高蓄積品種 Magda(MG)由来の *MLP-GR1*、*MLP-GR3* をそれぞれタバコ植物に過剰発現させた。NaCl、あるいはアブシジン酸(ABA)を添加した培地にこれらを播種し、発芽率を算出した。また、ウリ類炭疽病菌の胞子懸濁液をポテトデキストロース寒天培地に塗布し、MLP 溶液で湿らせたろ紙を置いて抗菌活性を測定した。さらに、*MLP* 発現タバコの葉の裏側から *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* をシリンジを用いて接種し、病斑の大きさや菌数を測定した。
〈結果と考察〉
*MLP* や *PR-10* を過剰発現した植物は、ストレス耐性が向上すると報告されていたが、*MLP* 発現タバコはベクターコントロール植物と比較して高塩濃度培地や ABA 添加培地において発芽率が低下した。このことから NaCl や ABA に対して感受性が高まったと考えられる。組換え MLP によるウリ科炭素病菌の菌糸成長の抑制は見られず、抗菌活性を示さないことが示唆された。一方、*P. syringae* の感染による *MLP* 発現タバコとベクターコントロール植物の病斑の大きさには顕著な差は見られなかったが、*MLP* 発現タバコにおいて菌数の低下が観察された。これらの結果から、ズッキーニ MLP も他の植物の MLP や PR-10 と同様、ストレス応答に関与していることが示唆された。

zucchini, major latex-like protein, stress response

講演番号：4J32a11
講演日時：3 月 20 日 12:00～ J 校舎 32 会場

# モノデヒドロアスコルビン酸レダクターゼの電子供与体 NADH から NADPH への特異性の変換

# Conversion of electron-donor specificity from NADH to NADPH in monodehydroascorbate reductase

○溝口 洋和、高野 和文、佐野 智（京都府立大院　生命環境）
○Hirokazu MIZOGUCHI, Kazufumi TAKANO, Satoshi SANO (Kyoto Prefectural Univ.)

植物体内では光合成に伴い、常に活性酸素種（ROS）が発生している。環境ストレスを受け、ROS の発生が増加すると、抗酸化剤や抗酸化酵素で消去し切れなくなった ROS による酸化的傷害が生じる。植物の主要な抗酸化剤であるアスコルビン酸（AsA）は、過酸化水素を消去する AsA ペルオキシダーゼの基質としても用いられるため、AsA を確保しておくことは環境ストレス耐性のために重要である。AsA は抗酸化作用で 1 電子酸化され、モノデヒドロアスコルビン酸（MDA）となる。MDA を AsA へと還元・再生する酵素の 1 つに、MDA レダクターゼ（MDAR）がある。この酵素は電子供与体として NADH を特異的に利用し、NADPH との反応性は極めて低い。しかし、ROS の主な発生源である葉緑体には NADPH が豊富に存在している。そこで NADPH と反応性が高く、葉緑体でより高効率に機能する変異酵素の作製を試みた。MDAR-NAD 酵素基質複合体の構造から、NAD は MDAR の Glu と水素結合していることがわかっている。この Glu が、NADPH の MDAR への結合を妨げていると考え、ホウレンソウ葉緑体型 MDAR の E254 の変異酵素を作製した。

作製した全ての E254 変異酵素において、NADH に対する速度論的パラメータは野生型酵素（WT）のものとほとんど変わらなかった。NADPH に対する *kcat*/*Km* は、WT と同じく側鎖に負電荷を持つ E254D で、WT のものと同様に低かった。また、NADPH に対する *kcat*/*Km* が最も高かった変異酵素は、側鎖が小さく電荷を持たない E254A であった。

さらに、隣接する Pro である P253 に変異を導入し、二重変異酵素を作製した。P253K/E254A、P253R/E254A および P253K/E254C では、NADPH に対する *kcat*/*Km* が高くなった。その中でも、P253K/E254A と P253R/E254A では、わずかながらではあるが NADPH に対する特異性が NADH に対するものより高くなる特異性の逆転が見られた。

これらの結果から、NADPH に特異的な変異酵素を得るためには、E254 を電荷を持たず、側鎖が小さなアミノ酸に置換し、NADPH が結合するためのスペースを作ることが必要であることがわかった。加えて、P253 を側鎖に正電荷を持つ Lys や Arg に置換して、NADPH を静電的に引き寄せることが必要である。

monodehydroascorbate reductase, reactive oxygen species, NADPH

講演番号：4J32a12
講演日時：3 月 20 日 12:15～ J 校舎 32 会場

ウマノスズクサにおけるアリストロキア酸生合成酵素遺伝子の探索と機能同定
Investigation of P450s and OMTs involved in aristolochic acid biosynthetic pathway in *Aristolochia debilis*
○松井 俊樹、堀 健太郎、山田 泰之、佐藤 文彦（京大院・生命）
○Toshiki MATSUI, Kentaro HORI, Yasuyuki YAMADA, Fumihiko SATO (Kyoto Univ.)

アリストロキア酸はイソキノリンアルカロイド(IQA)の一種であり、ウマノスズクサ属植物に含まれ、動物に対して毒性を示す。人に対しても腎細胞毒素や発癌物質として作用し、生薬であるウマノスズクサ科のウスバサイシンにアリストロキア酸を蓄積する地上部が混入することにより、アリストロキア腎症やバルカン腎症、尿路上皮癌を発症する健康被害が報告されている。アリストロキア酸はニトロ基を有する稀な天然化合物であり、IQA の共通経路で生合成されたのち特有のシトクロム P450 および *O*-メチル化酵素(OMT)によって産生されると推定されているが、酵素ならびに遺伝子の単離・同定はなされていない。アリストロキア酸生合成経路の解明は、ウマノスズクサ属のより安全な利用につながると考えられ、未同定のアリストロキア酸生合成酵素遺伝子の単離・同定およびその機能解析を行うこととした。

生合成経路の解明に当たって、まず、アリストロキア酸の産生を示す材料を安定に確保するため、ウマノスズクサ植物体より培養細胞を誘導するとともに、シュートを再分化させ、これらの細胞におけるアルカロイド含量を解析した。その結果、培養細胞においてもイソキノリンアルカロイドの蓄積が認められたが、アリストロキア酸はシュートのみに蓄積していた。引き続き、RNA-seq により培養細胞およびシュートのトランスクリプトームデータの取得を行った。得られた配列中に、既知 IQA 生合成遺伝子と相同性の高い配列を認めるとともに、それぞれの細胞において発現の違いがあることを認めた。アリストロキア酸生合成に関与する遺伝子として、シュートで高い発現を示す遺伝子、特に P450 と OMT を選抜した。その全長配列の単離と、異種発現系を用いた酵素機能解析を進めており、酵素活性と生合成における関与について報告する。

isoquinoline alkaloid, cytochrome P450, *O*-methyltransferase

講演番号：4J33a02
講演日時：3 月 20 日 09:35～ J 校舎 33 会場

# 基質認識メカニズム解明を目指したリゾプラズマローゲン特異的ホスホリパーゼ D の部位特異的変異導入解析

# Site-directed mutagenesis of lysoplasmalogen-specific phospholipase D to investigate the substrate recognition mechanism

○小山 貴之[1]、谷中田 昌彦[1]、酒瀬川 信一[2]、村山 和隆[3]、杉森 大助[1]([1]福島大理工、[2]旭化成ファーマ、[3]東北大院医工)
○ Takayuki OYAMA[1], Masahiko YACHUDA[1], Shin-ichi SAKASEGAWA[2], Kazutaka MURAYAMA[3], Daisuke SUGIMORI[1] ([1]Fukushima Univ., [2]Asahi Kasei Pharma Corp., [3]Tohoku Univ.)

【緒言】

プラズマローゲン（Pls）は*sn*-1位にアルケニルエーテル結合を持つリン脂質で、軽度認知症や冠動脈疾患（心筋梗塞、狭心症）の早期発見バイオマーカーとなることが近年報告されている。これまでに、我々は3種類の新規酵素とペルオキシダーゼを組み合わせたPlsの比色定量法を開発した。さらに、我々は新規酵素のうちリゾ型プラズマローゲン（LysPls）に特異的に作用する新規ホスホリパーゼD (LysPls-PLD)に関して、基質認識メカニズム解明を目指して部位特異的変異解析等を進めてきた。本発表では、部位特異的変異解析により得られた知見を報告する。

【方法・結果と考察】

LysPls-PLD の立体構造モデルおよび基質類似化合物とのドッキングシミュレーション解析の結果から、本酵素の活性中心周辺に位置し、基質と相互作用する可能性が考えられたアミノ酸(Met71, Trp282, Phe283 など）に着目し、部位特異的変異解析を行った。インバース PCR 法により各アミノ酸残基に置換した変異型酵素を作成し、pET24a(+)/*E. coli* BL21(DE3)を用いて C 末端 His6 付加により組換え発現させた。細胞破砕液中に酵素活性が認められた変異体についてはコリン型リゾプラズマローゲン(LysPlsCho)とエタノールアミン型リゾプラズマローゲン(LysPlsEtn)に対する活性試験を行った。実験の結果、M71G, A 変異型酵素は LysPlsCho に対する活性が著しく低下し、基質特異性が親酵素（WT）のそれから逆転した。また、F283G, E, K, R, W 変異型酵素のうち F283E が基質特異性逆転傾向を示唆する結果を得た。F283W は両基質に対して酵素活性が著しく低下した。以上の結果から、M71 と F283 は基質ヘッドグループの認識に関与している可能性が考えられた。ドッキングシミュレーション解析の結果、F283 は基質ヘッドグループのコリンとの距離が約 5Å と近く、基質ヘッドグループ認識への関与は十分考えられる。一方、M71 は基質ヘッドグループとの距離が約 10 Å以上あり、両者が相互作用するとは考えにくい。しかしながら、ネイティブ酵素においては両者の距離が近い可能性もあることから、今後 X 線結晶構造解析を進めたいと考えている。基質特異性が顕著に変化した変異型酵素については、現在カラム精製し、各基質に対する速度論解析等を進めている。本発表では、変異型酵素について詳細な基質特異性試験、速度論解析等の結果について報告する予定である。

*Thermocrispum* sp., Phospholipase D, Substrate-specificity modification

発表責任者：杉森 大助（sugimori@sss.fukushima-u.ac.jp）

講演番号：4J33a03
講演日時：3 月 20 日 09:50～ J 校舎 33 会場

# 酵母由来 Urethanase の精製及び性質検討

# Purification and characterization of an urethanase from Candida parapsilosis

○水呉 太一[1]、柿薗 ダララット[2]、藤原 可菜子[1]、向井 伸彦[2]、藤井 力[2]、正木 和夫[3]([1]広島大生物圏、[2]酒類総合研究所、[3]岐阜県産業技術センター)
○ Taichi MIZUKURE[1], Dararat KAKIZONO[2], Kanako FUJIHARA[1], Nobuhiko MUKAI[2], Tsutomu FUJII[2], Kazuo MASAKI[3] ([1]Hiroshima Univ., [2]National Research Institute of Brewing, [3]Industrial Technology Center,Gifu Prefectural Government)

カルバミン酸エチル（EC）は国際がん研究機関（IARC）によって「ヒトに対する発ガン性がおそらくある」とされるグループ 2A に属する化合物である。EC を分解する酵素は Urethanase と呼ばれ、EC をエタノール、二酸化炭素、アンモニアに加水分解する反応を触媒する。これまで Urethanase に関する報告は少なく、その特性も明らかになっていない。

本研究では、EC を分解できる酵母を選抜し、その Urethanase を精製し、特性を詳細に調べることとした。

まず、EC が単一の窒素源となる培地で培養し、良好な生育が見られるものをスクリーニングしたところ、*Candida parapsilosis* NBRC0708 が比較的良好な生育を示した。その菌体を回収し、ガラスビーズで破砕することで細胞抽出液を得た。透析を行い、イオン交換クロマトグラフィーにより細胞抽出液から目的酵素の精製を行った。得られた精製酵素を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）にて調べたところ、約 60 kDa の位置に単一のバンドを示した。また、BlueNative-PAGE では、240 kDa 付近に単一のバンドを示したことから、この酵素は、60 kDa のポリペプチド鎖から成るホモ四量体と予想された。

得られた精製酵素を用いて最適 pH・温度、基質特異性などを調査した。最適 pH は pH6.0~8.0、最適温度は 40℃であった。基質特異性については EC よりもアセトアミドに強い分解活性を示した。また精製酵素のアミノ酸配列を特定するため、N 末端アミノ酸配列解析を行い、得られた配列を BLAST にて解析した結果、*C. parapsilosis* 由来の機能未知タンパク質が 1 件ヒットした。*C. parapsilosis* NBRC0708 の対応する遺伝子を PCR により取得し、その配列解析を行うとともに、発現ベクターpG-1 にクローニングし、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* YPH499 株に形質転換し、組換え酵素の精製と酵素特性評価を行った。その結果、*C. parapsilosis* の細胞抽出液より精製した酵素と組換え酵素は同じ性質を示した。従って、本研究では *C. parapsilosis* 由来の Urethanase の性質を明らかとし、さらにその全配列を決定することができた。

urethanase, ethyl carbamate, *Candida parapsilosis*

講演番号：4J33a04
講演日時：3 月 20 日 10:05～ J 校舎 33 会場

# 海洋性細菌 *Shewanella* 属細菌の生産するポリエステル分解酵素の構造と機能

# Characterization of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from the marine bacterium *Shewanella* sp. JKCM-AJ- 6,1a.

○岸田 真季、宋 君哲、橘 熊野、粕谷 健一 (群大理工)
○Maki KISHIDA, Chun-Che SUNG, Yuya TACHIBANA, Ken-ichi KASUYA (Gunma Univ.)

【目的】

石油由来の汎用プラスチックは軽量かつ低コストで製造可能なために、我々の生活で広く利用されている。しかしながら自然環境中では分解されにくいために、廃棄物の海洋への蓄積が問題視されている。ポリ（3-ヒドロキシブタン酸）(P(3HB))をはじめとする生分解性プラスチックは自然環境中の微生物により水と二酸化炭素まで分解されるため注目され、土壌や淡水中での分解に関する調査が進んでいる。本研究では，研究例の少ない海洋中での P(3HB)分解機構を明らかにするために、海洋性 P(3HB)分解細菌を単離し、生産する酵素の性質・構造を調べた。

【方法】

静岡県焼津市の海水から P(3HB)分解細菌をクリアゾーン法により単離した。サザンハイブリダイゼーション法により菌株の生産する P(3HB)分解酵素遺伝子をクローニングし、酵素の一次構造を解析した。野生株の生産する野生型酵素(wPhaZ$_{she}$)および大腸菌内で生産させた破壊型酵素(rbPhaZ$_{she}$)の酵素を精製し、SDS-PAGE による分子量調査、速度論的解析、NaCl 濃度の影響、温度安定性、基質特異性を調べ、構造および機能の比較を行った。

【結果・考察】

海水から P(3HB)分解細菌として JKCM-AJ-6,1α株が単離された。16S rDNA 配列解析の結果、単離株は典型的な海洋性細菌に分類される *Shewanella* 属の近縁種であることが分かった。精製した wPhaZ$_{she}$ および rbPhaZ$_{she}$ に対し SDS-PAGE を行った結果、それぞれの分子量は 47,000 Da、70,000 Da であり、分子量に差が見られた。両酵素とも 15 ℃以上で著しく活性が低下し類似した温度不安定性を示した。しかし、NaCl 濃度の影響および速度論的解析では異なる傾向が見られ、wPhaZ$_{she}$ は NaCl 存在下で高い P(3HB)分解活性を示したのに対し、rbPhaZ$_{she}$ は NaCl 濃度の増加に伴い活性が低下した。また速度論的解析では rbPhaZ$_{she}$ は wPhaZ$_{she}$ より吸着定数が大きく、wPhaZ$_{she}$ では自己阻害が起こらなかった。

wPhaZ$_{she}$ の一次構造解析の結果から、wPhaZ$_{she}$ は予測される分子量より小さく、基質結合ドメインを欠損していることが明らかとなった。この基質結合ドメインの欠損により、wPhaZ$_{she}$ は海水のような高塩濃度環境で有利に働くことが可能になっていると考えられる。

Marine bacterium, Biodegradable polymer, P(3HB) depolymerase

発表責任者：粕谷健一（kkasuya@gunma-u.ac.jp）

講演番号：4J33a05
講演日時：3 月 20 日 10:20～ J 校舎 33 会場

中温性 *Bacillus pumilus* 由来脂肪族芳香族ポリエステル分解酵素の特徴づけ
Characterization of aliphatic-aromatic copolyester-degrading enzyme from the aerobic mesophilic *Bacillus pumilus*
○SOULENTHONE Phouvilay、室井 文篤、橘 熊野、山本 桐子、水野 司、粕谷 健一 (群大理工)
○Phouvilay SOULENTHONE, Fumihiro Muroi, Yuya Tachibana, Kiriko Yamamoto, Tsukasa Mizuno, Kenichi Kasuya (Gunma Univ.)

【目的】
脂肪属芳香属ポリエステルのポリブチレンアジペート-コ-テレフタレート（PBAT）は優れた熱特性および高い柔軟性を持ち，汎用プラスチックに近い性質を有する生分解性高分子の代表で， 農業用の生分解性マルチフィルムの材料として世界的に広く利用されている．現在までに，好熱性細菌の生産する PBAT 分解酵素の特徴づけが行われてきたが，中温性細菌の生産する PBAT 分解酵素の詳細な特徴づけは報告例が少ない．そこで，本研究は自然環境中における PBAT 分解機構を解明するために，土壌から単離した中温性バチラス属細菌の生産する PBAT 分解酵素のクローニングおよび特徴づけを行う．

【方法】
中温性 PBAT 分解細菌である *Bacillus pumilus* NKCM3201 株由来 PBAT 加水分解酵素(PBATH$_{Bp}$)の遺伝子をコローニングし，アミノ酸配列解析を行った．その後，*Brevibacillus* 発現系を用いて PBATHBp を過剰発現させ，精製した．本酵素の基質特異性評価，温度安定性評価，pH 安定性評価，および各種のポリエステルフィルムの酵素的分解試験を行った．また，推定される触媒三残基の S77，D133，H156 に変異させ，酵素変異体を作成し，パラニトロフェリニルアセテート（pNPA）を用いて活性測定した．

【結果】
アミノ酸配列解析を行った結果，PBATH$_{Bp}$ はリパーゼであることがわかった。本酵素は 4～40 ℃ でインキュベーション後，高い残存活性を示したが，45 ℃ 以上では，残存活性は著しく低下した．本酵素の温度感受性は，他の中温性微生物の生産する酵素の特徴に類似していた．また，pH5.0～10.5 の範囲で高い残存活性を示した．走査型顕微鏡を用い，PBAT フィルム表面の形態観察を行った結果，分解後にはフィルム表面に亀裂が生じることがわかった．PBAT フィルムの分子量測定を行ったところ，分解前後において分子量分布に差が見られなかった．これらの結果より，本酵素により PBAT フィルム表面が分解されたことがわかった．pNPA を用いて本酵素変異体の活性測定したところ，活性がほぼなくなったことから，本酵素の触媒三残基は S77，D133，H156 であり，セリン加水分解酵素スーパーファミリーに属していた．

Aliphatic-aromatic copolymester, lipase, biodegradable polymer

発表責任者：粕谷健一（kkasuya@gunma-u.ac.jp）

講演番号：4J33a06
講演日時：3 月 20 日 10:35～ J 校舎 33 会場

# 酵素的結晶変換法を用いた物質生産技術の開発

# Development of enzymatic transcrystallization method for efficient production of useful chemicals

○山本 和範[1,2]、荒木 通啓[3]、浅野 泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ、[2]JST, ERATO、[3]神大院・科技イノ）
○Kazunori YAMAMOTO[1,2], Michihiro ARAKI[3], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., Biotech. Res. Center & Dept. Biotech., [2]ERATO, JST, [3]Kobe Univ., Grad. Sch. Sci.)

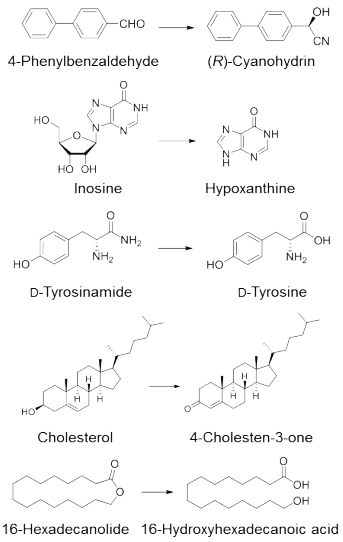
【目的】

酵素的結晶変換法は、基質を水に対する溶解度以上に添加した状態で酵素反応を行い、生成物を固体として生産する物質生産法である。有機溶媒を使用せず、小さな反応体積で大量の生成物を生産でき、ろ過などの簡単な操作で精製を行うことができるため、本法は、酵素を用いた工業的な物質生産に広く利用できる。しかし、本法を適用できる明確な要件は検討されておらず、その報告例は多くない。本研究では酵素的結晶変換が適用できる条件を実験的に見出すとともに、それらの結果および化合物の溶解度などの情報を基にして、酵素的結晶変換反応を予測するためのデータベースを作製した。

【方法および結果】

反応生成物の溶解度に注目して、酵素的結晶変換反応が利用できる要件を検討した。例えば、ヤケヤスデ (*Oxidus gracilis*) 由来ヒドロキシニトリルリアーゼ (OgraHNL) 1 U と 10 μmol 4-phenylbenzaldehyde, 100 mM KCN を 1 mL の 400 mM クエン酸緩衝液 (pH 4.2) で 30ºC、48 時間反応させ、固体の *R* 体シアノヒドリンへを収率 98%、91% ee で変換することに成功した。また、400 μmol inosine を含む 10 mL の培地で *Microbacterium* sp. TPU 3598 を 30ºC、72 時間培養し、固体の hypoxanthine を収率 74%で変換することができた。

結晶変換データベースの作製では、まず、酵素反応のデータベース KEGG、BRENDA に登録されている反応を抽出し、基質と生成物の水への溶解度を計算して、生成物の溶解度が 40 mM 以下となる反応を選抜した。次に、得られた 34,900 の反応から、生成物が固体である反応を抽出し、約 1,500 の結晶変換反応候補を選抜した。そして、これらの反応の検証実験を行い、現在までに D-アミノ酸アミダーゼによる D-tyrosinamide の D-tyrosine への変換、コレステロール酸化酵素による cholesterol の 4-cholesten-3-one への変換、エステラーゼによる 16-hexadecanolide の 16-hydroxyhexadecanoic acid への変換などデータベースに登録した複数の反応で酵素的結晶変換反応が可能であることを確認した。よって、本データベースには多くの酵素的結晶変換反応が含まれると言える。




Enzymatic transcrystallization, Database, Enzyme reaction

講演番号：4J33a07
講演日時：3 月 20 日 11:00～ J 校舎 33 会場

好塩性古細菌およびシアノバクテリアに保存された新規ビオチン生合成酵素の機能解析
Functional analysis of novel biotin biosynthetic enzyme conserved in halophilic archaea and cyanobacteria

○大石 恵太[1]、清水 哲[1]、小林 一幾[2]、富田 武郎[1]、田中 寛[2]、葛山 智久[1]、西山 真[1] ([1]東大・生物工学セ、[2]東工大・化学生命科学研究所)
○ Keita OISHI[1], Tetsu SHIMIZU[1], Ikki KOBAYASHI[2], Takeo TOMITA[1], Kan TANAKA[2], Tomohisa KUZUYAMA[1], Makoto NISHIYAMA[1] ([1]BRC, UTokyo, [2]Tokyo Institute of Technology, Laboratory for Chemistry and Life Science)

ビオチンは水溶性のビタミンであり、ビタミン $B_7$ とも呼ばれる。生体内において、糖や脂肪酸代謝に関与する複数のカルボキシラーゼの補酵素として機能し、全ての生物が利用している。ビオチンの生合成経路は、出発物質が異なる 3 種類が知られているが、経路の後半部は共通の酵素群 (BioF、BioA、BioD、BioB) が反応を触媒し、ビオチンを生合成する。多くのバクテリアや古細菌では、この酵素群をコードしている遺伝子がクラスターを形成している。

しかし、好塩性古細菌のビオチン生合成遺伝子クラスターの中には、*bioF*、*bioD*、*bioB* は含まれるものの *bioA* が存在せず、代わりに機能未知タンパク質をコードする遺伝子 (以下 *bioU* とする) が含まれている。Blast 検索の結果、*bioU* のホモログ遺伝子は近縁の好塩性古細菌に加えて、一部のシアノバクテリアのゲノム上にも見出された。また、*bioU* を有するシアノバクテリアも、好塩性古細菌と同様に *bioA* を欠いていた。BioA はビオチン生合成の後半部における 7-keto-8-aminopelargomic acid (KAPA) から 7,8-diaminopelargonic acid (DAPA) への変換反応を触媒するアミノ基転移酵素である。我々は、BioU が BioA の代わりに KAPA から DAPA の反応を触媒していると推測し、機能解析を進めることにした。初めに、大腸菌の *bioA* 破壊株を用いた相補実験を行った。その結果、*bioA* 破壊株は最少培地においてビオチン要求性を示すのに対し、好塩性古細菌 *Haloferax mediterranei* またはシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 由来の *bioU* を発現させた *bioA* 破壊株は、生育が野生型と同程度まで回復した。また、*Synechocystis* sp. PCC6803 の *bioU* 破壊株は、最少培地においてビオチン要求性を示した。さらに、*bioU* 破壊株に他のバクテリア由来の *bioA* を発現させたところ、最少培地での生育が回復した。これらの結果から、BioU が BioA と同様に KAPA から DAPA の反応を触媒する機能をもち、ビオチン生合成に関与する新規酵素であると明らかとなった。

現在、組換え BioU を用いた *in vitro* での触媒機構の解析を行っている。BioA は PLP 依存型のアミノ基転移酵素だが、BioU は BioA と相同性を示さず、PLP 結合モチーフもないことから、BioA とは異なる触媒機構を有すると考えられた。BioU の N 末端部分には、NADH または NADPH といったヌクレオチド結合サイトと推測されるモチーフがある。そのため、還元的アミノ化によって KAPA から DAPA の反応を触媒していると予想し、機能解析を進めている。また、BioU は既知の酵素と相同性を示さないことから、ユニークな立体構造を有する可能性がある。そのため、BioU の立体構造の解明を目指し、結晶化スクリーニングを進めており、今後立体構造が明らかになることが期待される。

biotin, cyanobacteria, halophillic archaea

発表責任者：西山真（umanis@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4J33a08
講演日時：3 月 20 日 11:15～ J 校舎 33 会場

本来の産生菌 *Sphingobium fuliginis* を用いた改良型変異 Organophosphorus hydrolase の産生
Production of Organophosphorus hydrolase with improved activity by mutation using the original producer of the enzyme, *Sphingobium fuliginis*

○石川 暁志[1]、岩田 なつみ[1]、有路 沙織[1]、浅野 直樹[1]、大森 毅[2]、瀬戸 康雄[2]、川原 一芳[1]([1]関東学院大学、[2]科学警察研究所)
○Satoshi ISHIKAWA[1], Natsumi IWATA[1], Saori ARIJI[1], Naoki ASANO[1], Takeshi OHMORI[2], Yasuo SETO[2], Kazuyoshi KAWAHARA[1] ([1]Kanto Gakuin University, [2]National Research Institute of Police Science)

【目的・背景】 Organophosphorus hydrolase (OPH)は、有機リン系化合物を加水分解する酵素で、好気性グラム陰性細菌である *Sphingobium fuliginis* ATCC 27551 よって産生される。本酵素はもともと、パラオキソンなどの有機リン系農薬を分解することが知られていたが、近年の研究で、OPH の活性中心に変異を導入した変異 OPH はサリンや VX などの神経剤も分解できることが報告され、これらの神経剤を使用した化学テロ対策としての研究が進められている。我々も変異型 OPH の大量発現や固定化の研究を進めており、これまでに変異 OPH を大腸菌に発現させる場合に比べて、*S. fuliginis* に発現させた場合、比活性の高い OPH が得られることを見出した[1)]。そこで本研究では大量に変異 OPH を得る系を確立するために、*S. fuliginis* が産生する野生型 OPH の菌体外への分泌について調べた。さらに大腸菌を用いて作製した変異 OPH を *S. fuliginis* を用いて菌体外に産生させる方法について検討したので報告する。
【方法】 OPH の活性は、パラオキソン分解により遊離する *p*-ニトロフェノールの発色で定量した。OPH をコードする大型プラスミド pPDL2 (37 kb) の脱落には、このプラスミドの複製開始点 (2099 bp)をクローニングした pBluescript *repA-oriV* を用いた。*S. fuliginis* の形質転換はエレクトロポレーション法により行った。
【結果・考察】
*S. fuliginis* ATCC 27551 株の培養上清液および菌体破砕液について OPH 活性を測定したところ、活性の 25.9%が培養上清に検出されることがわかった。従って、野生株では OPH は分泌性酵素であると推定された。次に、ATCC 27551 株に変異 OPH のみを産生させるために、pPDL2 の脱落を試みた。pBluescript *repA-oriV* を用いて形質転換し、アンピシリン耐性株を得た後、PCR にて OPH 遺伝子の確認を行ったところ、OPH 遺伝子が検出されない株が得られた。さらにこの株の破砕物および培養上清には活性が検出されなかったことから、pPDL2 脱落株が得られたと考えられた。この株に変異 OPH を産生させるために、シグナルペプチド部分を持つ変異 OPH 遺伝子と *S. amiense* プラスミドの複製開始点[2)]を有したプラスミドを作製した。今後はこのプラスミドを脱落株に導入し、培養上清への変異型 OPH の産生について検討する予定である。
1) Nakayama, K. et. al. Biosci Biotechnol Biochem. 80, 1024-1026, (2016)
2) Saito, M, et al. Microbes Environ., 21, 235-239, (2006)

Organophosphorus hydrolase, nerve agent, *Sphingobium fuliginis*

発表責任者：川原　一芳（kawahara@kanto-gakuin.ac.jp）

講演番号：4J33a09
講演日時：3 月 20 日 11:30～ J 校舎 33 会場

*Thermus thermophilus* HB27 株由来分岐鎖ポリアミン合成酵素の構造と機能
The structure and function of the branched-chain polyamine synthase from *Thermus thermophilus*

○秀瀬 涼太[1]、ウィハルドジャ ギタ[1]、豊田 真孝[2]、溝端 栄一[2]、井上 豪[2]、藤原 伸介[1]（[1]関学大理工、[2]阪大工）
○Ryota Hidese[1], Gita Wihardja A.[1], Masataka Toyoda[2], Eiichi Mizohata[2], Tsuyoshi Inoue[2], Shinsuke Fujiwara[1] ([1]Kwansei-Gakuin Univ., [2]Osaka Univ.)

【研究目的】ポリアミンは様々な生命現象に関与している低分子の塩基性物質で、あらゆる生物に含まれる。（超）好熱菌は一般的なポリアミンであるスペルミジン[34]（鉤括弧の内の数字は両端にあるアミノ基と中間のアミノ基で挟まれるメチレン基の数を示す）等に加えて、長鎖または分岐鎖のポリアミンを有する。分岐鎖ポリアミンは、新規アミノプロピル基転移酵素 BpsA(1)の触媒作用により、アデノシルメチルチオプロピルアミン（脱炭酸化された *S*-アデノシルメチオニン（dcSAM））をアミノプロピル基供与体として、スペルミジン[34]やノルスペルミジン[33]より生成される。超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* は $N^4$-ビス（アミノプロピル）スペルミジン[3(3)(3)4]のみをもつのに対し、好熱性バクテリア *Thermus thermophilus* HB27 株は、$N^4$-アミノプロピルノルスペルミジン[3(3)3]など 3 級アミンに加えて、$N^4$-ビス（アミノプロピル）ノルスペルミジン[3(3)(3)3]や $N^4$-ビス（アミノプロピル）スペルミジン[3(3)(3)4]など多様な分岐鎖ポリアミンを同等の濃度でもつ(2)。本研究では、*T. thermophilus* BpsA（*Tt*-BpsA）の触媒反応機構を、X 線結晶構造解析及び反応速度論的解析により推定した。また、*T. kodakarensis* BpsA（*Tk*-BpsA）の性質の違いから細胞内ポリアミンの組成の違いが生じる点を考察した。

【結果と考察】N 末端側に His-tag を付加した組換え *Tt*-BpsA を大腸菌で発現し、精製した。既知のアミノプロピル基転移酵素（SPD 合成酵素など）とは異なり、*Tt*-BpsA の反応は *Tk*-BpsA と同様にピンポン機構で進行することが予想された。触媒反応効率を比較した結果、*Tk*-BpsA は $N^4$-アミノプロピルスペルミジン[3(3)4]に対して、*Tt*-BpsA（$k_{cat}/K_m = 8.3\times10^2$ $s^{-1}$ $M^{-1}$）と比べて約 500 倍高い触媒効率を示した。一方、$N^4$-アミノプロピルノルスペルミジン[3(3)3]を基質としたとき、*Tt*-BpsA（$k_{cat}/K_m = 9.9\times10^2$ $s^{-1}$ $M^{-1}$）は *Tk*-BpsA と比べて同等の触媒効率を示した。以上より、いずれの基質に対しても同等の触媒効率を有している事が、HB27 株の多様な分岐鎖ポリアミン組成を可能にしていると考えられた。次に、*Tt*-BpsA-$N^4$-アミノプロピルスペルミジン-メチルチオアデノシン三者複合体の X 線結晶構造を 1.8 Å の分解能で決定した。*Tt*-BpsA は *Tk*-BpsA の活性部位の立体構造と類似しており、活性部位のアミノ酸残基は両酵素とも高度に保存されていた。一方、dcSAM のアデニン部位の 6 位のアミノ基に配向したアミノ酸残基がそれぞれ異なっていた（*Tt*-BpsA, L345; *Tk*-BpsA, Y343）。本発表では、*Tt*-BpsA L345Y 変異型酵素の基質特異性の検証結果も合わせて報告する。

(1) 秀瀬 涼太, 藤原 伸介. 酵素工学ニュース, 75 (2016); (2) Hamana et al. J. Jpn. Soc. Extremophiles, 7:10-20 (2008)

Enzyme, Polyamine, Thermophile

発表責任者：藤原伸介（fujiwara-s@kwansei.ac.jp）

講演番号：4J33a10
講演日時：3 月 20 日 11:45～ J 校舎 33 会場

# ピロリン酸依存性リン酸化酵素の基質認識機構の解明

# Structural study on the ligand-binding mode of a pyrophosphate-dependent kinase

○永田 隆平[1]、藤橋 雅宏[1]、佐藤 喬章[2]、跡見 晴幸[2]、三木 邦夫[1] ([1]京大院理、[2]京大院工)
○Ryuhei NAGATA[1], Masahiro FUJIHASHI[1], Takaaki SATO[2], Haruyuki ATOMI[2], Kunio MIKI[1]
([1]Grad. Sch. of Sci., Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. of Eng., Kyoto Univ.)

【研究背景】リン酸化酵素は、リン酸基供与体として ATP を用いるのが一般的だが、中にはピロリン酸（PPi）を ATP の代わりに用いるものも存在する。PPi 依存性リン酸化酵素については、PPi 結合型構造が報告されておらず、その PPi 認識機構は明らかにされていない。本研究では、新規の PPi 依存性リン酸化酵素を同定し、結晶構造からその PPi 認識機構を明らかにした。

【方法・結果】初めに、新規リン酸化酵素の基質特異性を、既知の基質非結合型構造に基づいて調べた。この酵素はリボキナーゼファミリーに属するが、同ファミリーの ATP 依存性酵素とは ATP 認識部位の構造が異なっている。そのため、ATP 以外を利用すると予想された。一方、リン酸基受容体結合部位の構造は *myo*-inositol リン酸化酵素のものとよく似ているため、*myo*-inositol を認識すると考えられた。実際に活性を調べたところ、本酵素は PPi のみを使って *myo*-inositol をリン酸化し、ATP や ADP は利用しないことが分かった。

次に、本酵素と *myo*-inositol と PPi アナログとの三者複合体の結晶構造を 1.70Å 分解能で決定した。この構造と ATP 依存性 *myo*-inositol リン酸化酵素の構造の比較から、PPi 認識に特徴的な 2 つの塩基性残基が明らかになった（図 1）。また、PPi 結合部位にはもう一つアルギニン残基が存在している。PPi アナログ結合型構造ではこの残基はディスオーダーしていたが、結晶化条件に含まれる硫酸イオンが PPi アナログの代わりに結合した構造では硫酸イオンと相互作用していた（図 2）。そのため、このアルギニンも PPi の認識に関わると考えられた。これら 3 つの塩基性残基をそれぞれアラニンに置換した変異体では、いずれも活性が野生型の 1/10 以下になった。これにより、これらの 3 残基が酵素反応に関わることが確かめられた。これらの残基は、リボキナーゼファミリーの ATP 依存性酵素では保存されていないため、PPi 依存性酵素に特徴的なものだと考えられる。

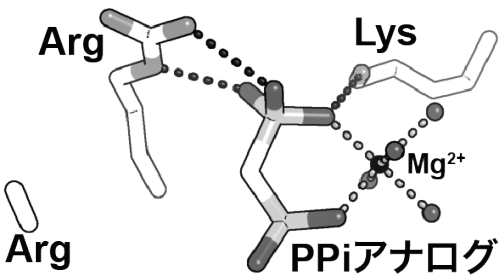


図 1. PPi アナログ結合型構造

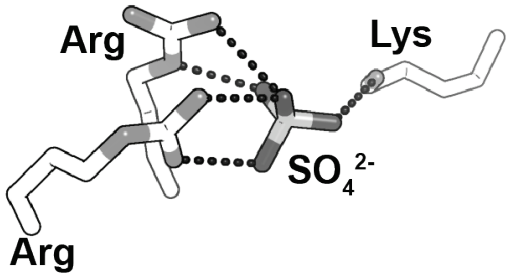


図 2. 硫酸イオン（$SO_4^{2-}$）結合型構造

pyrophosphate, ribokinase, crystal structure

講演番号：4J34a03
講演日時：3 月 20 日 09:50～ J 校舎 34 会場

Identification of a novel guanosine 5'-monophosphate reductase from pathogenic protozoa *Trypanosoma congolense*

○Albertus SARWONO[1], Keisuke SUGANUMA[2,3], Shinya MITSUHASHI[1], Tadashi OKADA[2,4], Simon Peter MUSINGUZI[2], Kengo SHIGETOMI[1], Noboru INOUE[5], Makoto UBUKATA[1]
([1]Graduate School of Agriculture, Hokkaido Univ., [2]National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro Univ. of Agr. and Vet. Med., [3]Research Center for Global Agromedicine, Obihiro Univ. of Agr. and Vet. Med., [4]Faculty of Medicine, Univ. of Miyazaki, [5]Obihiro Univ. of Agr. and Vet. Med.)

*Trypanosoma congolense* is one of the most widely spread pathogenic *Kinetoplastidae* in most cases of African Animal Trypanosomosis (AAT). The highly streamlined salvage purine nucleotide biosynthesis of *Kinetoplastidae* has been identified as an interesting drug target, since it is essential for the parasite's nucleic acid biosynthesis. In this study, a gene from *T. congolense*, TcIL3000_5_1940, was identified as a gene encoded guanosine 5'-monophosphate reductase (GMPR), which is one of the essential enzymes that modulate the purine biosynthesis pathway. The gene was expressed in *E. coli*, and the gene product was enzymatically confirmed as a unique GMPR, designated as TcGMPR. This enzyme was constitutively expressed in glycosomes at all of the parasite's developmental stages just like other purine nucleotide metabolic enzymes. These results confirmed that TcGMPR acts cooperatively with other purine nucleotide metabolic enzymes in the glycosomes. Interestingly, the enzyme also showed a reverse reaction catalytic activity in the presence of ammonia, suggesting that the enzyme might be an ancestor protein, which was important in the ancestor organism's survival in the early earth atmosphere. Lastly, mycophenolic acid (MPA) was identified as a TcGMPR inhibitor, thus become one of feasible lead compounds in the development of GMPR inhibitors. Taken together, this study identified a novel drug target and its potential inhibitor, thus provides a deeper insight into the therapeutic strategy against AAT.

*Trypanosoma congolense*, GMP reductase, purine biosynthesis pathway

発表責任者：Makoto Ubukata（m-ub@for.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：4J34a04
講演日時：3 月 20 日 10:05～ J 校舎 34 会場

超好熱古細菌 *Methanopyrus kandleri* 由来 Endonuclease III の機能解析
Functional analysis of endonuclease III from a hyperthermophilic archaeon *Methanopyrus kandleri*
○上松 敦、志田 敏夫（信大院繊・応生）
○Atsushi AGEMATSU, Toshio SHIDA (Div. Appl. Biol., Grad. Sch. Sci & Tech., Shinshu Univ.)

【背景・目的】DNA は放射線や紫外線、代謝の過程で生じる活性酸素によって常に損傷が引き起こされている。このような損傷を防ぐために生体内には DNA 修復に関与する多様な酵素が存在する。EndonucleaseⅢは DNA 修復経路の一つである塩基除去修復経路で働く酵素の一種である。この酵素は２つの活性を持ち、1 つは DNA の酸化的損傷である、thymine glycol や 5-hydroxycytosine を認識しデオキシリボース環と核酸塩基を結ぶ *N*-グリコシド結合を切断する *N*-グリコシラーゼ活性。もう 1 つは核酸塩基部分が脱離して生じる AP（apurinic／apyrimidinic）部位の 3’側を切断する AP リアーゼ活性である。超好熱古細菌 *Methanopyrus kandleri*(生育環境温度 84℃～110℃)のような高温下で生息している生物では特に DNA 損傷を受けやすいため、常温に生息している生物の EndonucleaseⅢとは異なる特性を持っている可能性が考えられる。本研究では *M. kandleri* 由来の EndonucleaseⅢの機能解析を行った。
【方法、結果】*M. kandleri* のゲノム DNA を鋳型に PCR で目的遺伝子を増幅し、大腸菌発現用ベクター pET15b に挿入した。大腸菌 BL21(DE3)を用いて発現・精製した。高温下で酵素活性の測定を行うため、基質 DNA の配列中に GCGAAGC 配列を入れ、高い熱安定性のヘアピン構造を持つ DNA を基質と使用した。AP リアーゼ活性の測定は、dU 残基を含む DNA の 5’末端を放射性同位体 $^{32}$P で標識したのち、uracil-DNA glycosylase (UDG)で処理し、AP 部位（デオキシリボース残基）を含む基質 DNA を調製して用いた。*N*-グリコシラーゼ活性測定には thymine glycol を配列中に持つ DNA 基質を用いた。これらの基質を用いて酵素の至適温度や熱安定性など酵素の特性を調べた。
　至適反応温度は AP リアーゼ活性が 85℃、グリコシラーゼ活性は 75℃～80℃であった。60℃で 15 分間保温すると *N*-グリコシラーゼ活性は失われるのに対し、AP リアーゼ活性は 80％の活性を保持していた。これらの結果より本酵素は高い至適温度、熱安定性を持つことが分かった。しかし、*M. kandleri* の生育環境温度(84℃～110℃)ではほとんど活性を失うため生体内ではタンパク質の安定性に関与する他の要因が考えられる。

Hyperthermophilic archaea, Endonuclease III, Thermostable protein

発表責任者：上松　敦（15fm701a@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：4J34a05
講演日時：3 月 20 日 10:20～ J 校舎 34 会場

結核菌由来 diadenosine tetraphosphate 加リン酸分解酵素の新規阻害剤と抗結核菌活性
Novel inhibitors of diadenosine tetraphosphate phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis* and their antituberculosis activity

○森 茂太郎、本田 尚子、金 玄、林原 絵美子、柴山 恵吾（感染研）
○Shigetarou MORI, Naoko HONDA, Hyun KIM, Emiko RIMBARA, Keigo SHIBAYAMA (NIID)

【背景・目的】既存の抗結核薬に耐性を示す多剤耐性結核菌の蔓延が世界中で問題となっており、新規抗結核薬の開発が急務となっている。そこで我々は、diadenosine tetraphosphate（$Ap_4A$）代謝経路に着目して研究を行っている。$Ap_4A$ 代謝経路に関わる酵素のうち、結核菌由来新規 $Ap_4A$ 加リン酸分解酵素（MtAPA）は、遺伝子破壊株を用いた研究や *in silico* 解析の結果より新規抗結核薬の有力な標的候補の１つとして考えられている。従って、本酵素の活性を阻害する新規化合物をデザインすることは新規抗結核薬の開発につながるものとして期待されている。これまでに我々は、MtAPA の詳細な機能構造相関解析を行い、MtAPA が特異的な基質結合部位を形成していることを示している。このことから、機能構造相関解析の結果に基づいて、本酵素の活性を特異的に阻害する新規化合物をデザインすることが可能であると考えられた。
【方法】MtAPA の新規阻害剤の候補化合物は、立体構造情報に基づいたドッキングシミュレーションにより選択した。ドッキングシミュレーションは myPresto プログラムを使用し、化合物データベースは Zinc データベース、並びに LigandBox データベースから入手した。ドッキングシミュレーションにより選択した新規阻害剤の候補化合物について、MtAPA に対する阻害活性の測定を行った。阻害活性は、MtAPA が基質である $Ap_4A$ を加リン酸分解することによって生成される ATP の量について市販のキットを用いて測定することによって評価した。また、結核菌に対する生育阻害活性は、微量液体希釈法によって最小発育阻止濃度（MIC）を測定することによって評価した。
【結果・結論】ドッキングシミュレーションにより、約 850 万種類の化合物の中から MtAPA の標的部位と強く相互作用することによって本酵素の活性を阻害することが予想される化合物として、104 種類の化合物を選択した。阻害活性の測定結果より、104 種類の化合物のうち 15 種類の化合物が実際に本酵素の活性を阻害することが示された。従って、本ドッキングシミュレーションのヒット率は約 14%であった。15 種類の新規阻害剤は結核菌に対して顕著な生育阻害活性を示さなかったが、そのうち 1 種類の化合物は結核菌に対して弱い生育阻害活性を示した。そこで、この化合物の構造類縁体を用いて各測定を行った結果、MtAPA を含む抗酸菌由来 $Ap_4A$ 加リン酸分解酵素の活性のみを阻害するとともに結核菌に対して生育阻害活性を示す化合物（化合物 A）を同定した。化合物 A の結核菌に対する最小発育阻止濃度（MIC）は 32 μg/mL であった。今後は化合物 A の構造最適化などを行うことにより、新規抗結核薬の開発につながることが期待される。

Mycobacterium tuberculosis, drug design, in silico screening

発表責任者：森 茂太郎（mshige@niid.go.jp）

講演番号：4J34a06
講演日時：3 月 20 日 10:35～ J 校舎 34 会場

# 高度好塩菌 *Haloarcula japonica* 由来 2-デオキシリボース 5-リン酸アルドラーゼに関する研究
# First characterization of extremely halophilic 2-deoxy-D-ribose-5-phosphate aldolase

○大志田 達也[1]、林 順司[1]、里村 武範[2]、川上 竜巳[3]、大島 敏久[4]、櫻庭 春彦[1] ([1]香川大農、[2]福井大工、[3]徳島大生物資源、[4]大工大工)
○ Tatsuya OHSHIDA[1], Junji HAYASHI[1], Takenori SATOMURA[2], Ryushi KAWAKAMI[3], Toshihisa OHSHIMA[4], Haruhiko SAKURABA[1] ([1]Kagawa Univ., [2]Fukui Univ., [3]Tokushima Univ., [4]Osaka Inst. Tech.)

【目的】アルドラーゼは可逆的にアルドール縮合反応を触媒する酵素であり、光学活性化合物の合成に利用できる。2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼ(DERA)はアセトアルデヒドと D-グリセルアルデヒド-3-リン酸から 2-デオキシリボース-5-リン酸(DRP)を合成する反応を可逆的に触媒する。DERA はアルドラーゼの中で基質特異性が比較的広く、多様なアルデヒド分子間の縮合反応を触媒出来るため、抗ウイルス剤や抗高脂血症治療薬等のビルディングブロック合成等への産業利用が期待されている。しかし、通常微生物由来の酵素は、高濃度のアルデヒドで失活するため、実用化はされていない。また先行研究で調べられた超好熱菌由来の酵素は、アルデヒド存在下では安定であるが、工業的に用いる常温付近において活性が低いことが判明している。一方、高度好塩菌由来の酵素は高濃度の塩存在下のような水分活性の低い環境でのみ立体構造を維持することが可能であり、アセトアルデヒド等の存在下でも安定で高活性を示すことが期待できる。高度好塩菌に DERA が存在すれば常温での高活性と高い安定性を示す可能性があるが、これまで高度好塩菌由来の DERA について研究報告例は無い。今回、我々は高度好塩菌に初めて DERA を見出し、その機能解析に成功した[1)]。
【方法・結果】高度好塩菌 *Haloarcula japonica* 由来 DERA(HjaDERA)ホモログ遺伝子のクローニングを行い、大腸菌による発現系を構築した。発現させたタンパク質を精製途中で高濃度塩処理を行うことにより、活性化リコンビナント酵素を取得することに成功した。精製酵素を用いて酵素化学的諸性質を解析したところ、HjaDERA は大腸菌由来 DERA よりも熱耐性に優れ、超好熱菌由来 DERA よりも常温で高活性を示した。また、様々な有機溶媒に対して耐性を示すことが明らかとなった。更に、アセトアルデヒド 3 分子を基質としたアルドール縮合反応（スタチンのビルディングブロックとなる 2,4,6-トリデオキシ-D-エリスロヘキサピラノシドが産物となる）では、大腸菌由来 DERA や超好熱菌由来 DERA に比べ、高い生産性を持つことが確認された。今後は様々なアルデヒド類を用いた合成反応を検討し、高度好塩菌由来 DERA の応用面に向けての展開を図る。

1) T. Ohshida *et al.*, *Protein Expression and Purification* **126**, 62-68(2016)

2-Deoxy-D-ribose-5-phosphate aldolase, Halophile, Archaea

講演番号：4J34a07
講演日時：3 月 20 日 11:00～ J 校舎 34 会場

# 組換えヒト nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase 1 (NMNAT1) の調製，諸性質および逆反応を利用した NMN 製造の試み

# Preparation and some enzymatic properties of recombinant human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase 1 (NMNAT1) and its application to the production of NMN

○小根田 洋史 (長田産業)
○Hiroshi Oneda (Nagata sangyo)

【はじめに】NMNAT は Nicotinamide mononucleotide (NMN) と ATP から NAD を合成する酵素であり、NAD 生合成系の最終段階を担っている。 本酵素はこれまでにヒト胎盤および大腸菌発現系可溶性画分からの精製例が報告されているが、大腸菌発現系で形成する不活性封入体からの再生は報告例がない。本研究では NMNAT1 の再生条件を検討し、再生により得られた酵素の諸性質を調べた。また本酵素の基質である NMN は近年その生理機能が注目されているが、再生酵素を用いた NMN の製造方法についても検討した。
【方法・結果】ヒト膵臓 cDNA から NMNAT1 遺伝子をクローニングし、大腸菌 pET 発現系により発現させたところ、不活性封入体を形成した。再生条件を検討した結果、1 M Arg 存在下、pH 8.0, 4℃, 24 h 処理により、5.5 mg のタンパク質を含む不活性封入体標品から 5.0 mg の NMNAT1 が再生し、疎水性相互作用 Phenyl カラムを用いて 3.7 mg の均一標品を得ることができた。精製酵素の活性は 56 U/mg であり、既報値よりも高活性であった。37℃における至適 pH は 8.1、また pH 7.5 における NMN, ATP, NAD およびピロリン酸 (PPi) の $K_m$ はそれぞれ 29.6, 27.3, 57.4 および 114 μM と求められた。NMNAT は酵素活性に二価カチオンを必要とするが、検討した濃度域(～40 mM)では Mg 存在下で最も高い活性を示した。Co および Zn は至適濃度では Mg に近い活性を示したが過剰量の添加により活性の低下がみられた。逆反応による NMN の生成条件を検討したところ、3 mM Co, 180 mM PPi 存在下、pH 7.5, 37℃において 15 mM(1%)および 75 mM(5%) NAD からそれぞれ 99.0%および 84%の変換効率で NMN が得られた。

NMN, NMNAT, refolding

講演番号：4J34a08
講演日時：3 月 20 日 11:15～ J 校舎 34 会場

超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* 由来ヘリカーゼの PCR 反応への影響
Effect of helicases from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis* on PCR
○川戸 克展[1]、秀瀬 涼太[1]、藤原 綾子[1]、保川 清[2]、藤原 伸介[1,3]([1]関学大理工、[2]京大農、[3]関学大生物機能基材研究開発セ)
○Katsuhiro KAWATO[1], Ryota HIDESE[1], Ayako FUJIWARA[1], Kiyoshi YASUKAWA[2], Shinsuke FUJIWARA[1,3] ([1]Kwansei-Gakuin Univ., [2]KyotoUniv., [3]Research Center for Inteligent Bio-Materials)

【背景と目的】ヘリカーゼは ATP 依存的に核酸の二本鎖をほどき、複製や RNA スプライシングに関わる酵素であり、そのアミノ酸配列から 6 つのスーパーファミリー（SF1-6)に分類される。これまでに、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* の SF2 ヘリカーゼ TK0566（*Tk*-EshA）が PCR の連鎖反応の段階で非特異的に結合したプライマーを 3′突出方向から剥がし、PCR 反応における誤増幅を低減する効果（ノイズ低減効果）を有することを示した(1)。本研究では、*T. kodakarensis* の SF2 ヘリカーゼ TK0306、TK0460 及び SF1 ヘリカーゼ TK0178 に着目し、これらヘリカーゼの酵素性質を調べ、PCR 反応時のノイズ低減効果を検証した。

【結果と考察】 組換え TK0306、TK0460、TK0178 を大腸菌で発現させ精製した。TK0306、TK0460、TK0178 の ATPase 活性の至適温度はそれぞれ 50℃、60℃、100℃であった。円二色性解析で、TK0178 タンパク質は 90℃まで安定に二次構造を維持したのに対し、TK0460 や TK0306 は 80℃以上で変性が認められた。次に二本鎖合成ヌクレオチドを基質にアンワインド活性を測定した。TK0460 は 3′突出型二本鎖 DNA にアンワインド活性を示し、TK0306、TK0178 は 5′突出型二本鎖 DNA にアンワインド活性を示した。次に *T. kodakarensis* 由来 16S rDNA 領域を標的に KOD ポリメラーゼを用いたときの PCR ノイズ低減効果を検証した。TK0306 や TK0460 ではノイズ低減効果は認められなかったが、TK0178 を添加することで顕著なノイズ低減効果が確認された。ノイズ低減効果を *Tk*-EshA と比較したところ、*Tk*-EshA ではノイズ低減に 100 nM の添加が必要であったのに対し、TK0178 では 10 nM で同等の効果が得られた。70℃（PCR の伸長反応温度）では TK0178 の ATPase 活性（30 nmol/min/mg）は、*Tk*-EshA のそれ（80 nmol/min/mg）と比べて低いが、80℃でも活性を示した。これらのことから、PCR 時のノイズ低減は、ヘリカーゼの高温での活性とタンパク質としての耐熱性に強く依存していると推察される。今回、高 GC 含量の DNA を鋳型とした場合、競合するプライマーを用いた場合の PCR のおける影響についても報告する、また Pol I 型 DNA ポリメラーゼである Taq DNA ポリメラーゼを用いた場合のノイズ低減効果についても比較する。

(1) Fujiwara et al. Appl. Environ. Microbiol. 82(10):3022-31 (2016).

Helicase, PCR, Hyperthermophile

発表責任者：藤原伸介（fujiwara-s@kwansei.ac.jp）

講演番号：4J34a09
講演日時：3 月 20 日 11:30～ J 校舎 34 会場

# *Rhodococcus rhodochrous* J1 株にコードされている Vsr エンドヌクレアーゼの生化学的性質

Biochemical properties of second Vsr endonuclease from *Rhodococcus rhodochrous* J1

○加茂 貴宏、大内 優彦、喜多 恵子（京大院農）
○Takahiro KAMO, Masahiko OUCHI, Keiko KITA (Kyoto Univ.)

【背景・目的】原核生物に存在するメチル化塩基の一種である 5-メチルシトシンは、水との反応により脱アミノ化しチミンとなり、T/G ミスマッチが生じる。DNA ミスマッチが DNA 複製を経て変異として蓄積されないように修復する機構の一つに、Very short patch repair（Vsr）がある。Vsr 機構の中で Vsr エンドヌクレアーゼは重要な役割を果たしており、T/G ミスマッチを認識し、チミンの 5´端を切断する活性を持っている。Vsr エンヌクレアーゼの中には大腸菌由来の V.EcoKDcm のように高い配列特異性を持つものが存在する。*Rhodococcus rhodochrous* J1 株にもアミノ酸配列の相同性から、Vsr エンドヌクレアーゼと考えられる酵素が少なくとも 2 種類存在しており、そのうちの 1 つについては、配列特異性を明らかにしている（1）。本研究では未解析であった酵素を大腸菌 JM109 株で発現させ、精製した酵素の生化学的諸性質を調べた。

【方法】His タグを付加した対象タンパク質を大腸菌 JM109 株で発現させ、His タグ特異的カラムを用いて精製した。様々なミスマッチを持つ二本鎖 DNA を基質として本酵素を反応させ、マイクロチップ電気泳動装置で解析を行った。さらに、T/G ミスマッチの前後の塩基を変化させた 16 種類の二本鎖 DNA を基質として本酵素と反応させ、切断効率を比較した。

【結果】本酵素は T/G 以外のミスマッチをもつ DNA には切断活性を示さないが、T/G ミスマッチをもつ DNA には切断活性を示した。また本酵素は、用意した T/G ミスマッチの前後の塩基が異なる二本鎖 DNA 基質 16 種類全てに対して切断活性を示したが切断効率を比較すると大きな差が見られた。そのため、本酵素の切断活性は T/G ミスマッチの周囲の配列に影響を受けることが示唆された。現在、T/G ミスマッチの近くの基質配列の切断活性への影響をさらに調べている。

（1）日本農芸化学会　2015 年度大会

*Rhodococcus rhodochrous* , very short patch repair, endonuclease

講演番号：4J34a10
講演日時：3 月 20 日 11:45～ J 校舎 34 会場

# 組換え *Flavobacterium psychrophilum* コラゲナーゼの発現

# Expression of recombinant *Flavobacterium psychrophilum* collagenase

○森下 諒[1]、森 真璃子[2]、中山 仁志[3]、田中 啓友[4]、服部 俊治[4]、滝田 禎亮[1,2]、保川 清[1,2]（[1]京大農、[2]京大院農、[3]和歌山県水産試験場、[4]（株）ニッピ）
○Ryo Morishita[1], Mariko Mori[2], Hitoshi Nakayama[3], Keisuke Tanaka[4], Shunji Hattori[4], Teisuke Takita[1,2], Kiyoshi Yasukawa[1,2] ([1]Faculty of Agric., Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [3]Wakayama Prefectural Fisheries Experimental Station, [4]Nippi Research Institute of Biomatrix)

【目的】*Flavobacterium psychrophilum* はアユ冷水病の原因菌である。近年、本菌が産生するコラゲナーゼ（fpcol）がアユ冷水病の原因毒素であることが示唆された[1)]。本研究では、本酵素の性状解析およびアユ冷水病ワクチンとしての可能性を検討するために、組換え fpcol の発現を試みた。

【方法】1. 大腸菌を宿主とした分泌発現：プロモーター配列および Met1−Lys960（全長）をコードする fpcol 遺伝子を pUC18 に挿入し、発現プラスミド pUC18-fpcol を構築し、大腸菌 JM109 に導入した。形質転換菌を 19℃で 7 日間培養し、培養上清を回収した。2. *Brevibacillus chosinensis* を宿主とした分泌発現：Tyr76-Lys960 をコードする DNA を pNY326 に挿入し、Sec 分泌シグナルと fpcol の融合タンパク質の発現プラスミド pNY326-fpcol を構築し、*B. chosinensis* SP3 に導入した。形質転換菌を 18℃で 5 日間培養し、培養上清を回収した。3. 大腸菌を宿主とした菌体内発現：C 末端に$(His)_6$を有する Thr70−Gly883 をコードする DNA を pET22b(+)の T7 プロモーター配列の下流に挿入し、発現プラスミド pET-fpcol を構築し、大腸菌 BL21(DE3)に導入した。形質転換菌を 37℃で培養し、対数増殖期に IPTG が 0.5 mM になるように加え、37℃でさらに 4 時間培養し、菌体を回収した。

【結果と考察】1. 分泌発現させた fpcol の性状解析：pUC18-fpcol が導入された大腸菌の培養上清をゼラチンザイモグラフィーにかけると、Met1-Lys960 の分子質量（103 kDa）とほぼ同じ 110, 100, 95 kDa のバンドが現れた。一方、pNY326-fpcol が導入された *B. chosinensis* の培養上清をかけると、Tyr76-Lys960 の分子質量（95 kDa）よりも小さい 65.4、54.0、42.7 kDa のバンドが現れ、fpcol がプロセシングを受けたと考えられた[2)]。2. 菌体内発現させた fpcol の性状解析：pET-fpcol が導入された大腸菌の可溶性画分をゼラチンザイモグラフィーあるいは$(His)_6$を認識する抗体を用いたウエスタンブロットにかけてもバンドが現れなかった。一方、不溶性画分をウエスタンブロットあるいは SDS-PAGE にかけると、いずれも Thr70−Gly883-$(His)_6$の分子質量（87 kDa）に相当する 1 本のバンドが現れた。この画分を 6 M 塩酸グアニジンで変性後、1 M アルギニン存在下で透析により塩酸グアニジンを除くことにより、可溶性の fpcol が得られた。

【文献】1. Nakayama H, Tanaka K, Teramura M, Hattori S. (2016) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **80**, 135-144.
2. Nakayama H, Mori M, Takita T, Yasukawa K. et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* in press

collagenase, cold water disease, metalloprotease

発表責任者：森下　諒（morishita.ryo.66s@st.kyoto-u.ac.jp）

# シンポジウムプログラム

## 3月18日（土）9:00〜12:00，または14:00〜17:00

### 2SY01　地域特産物のブランド化と六次産業化

地域の立地条件を活かして生産される伝統野菜や薬用作物等の地域特産物には，健康増進など消費者ニーズに対応した様々な機能性をもつものがある．しかしながら，京野菜など知名度の高いものは数少なく，多くの有用性をもちながらも，一般的に知られていない農作物も多数存在する．このような地域特産農作物をよりメジャーなものとするためには，多くの生産者が安定生産するための栽培技術を確立するだけでなく，有用成分を高めるなどの「ブランド価値」が明確化された魅力ある農産物へと進化させること，さらには加工・販売に関わる事業との融合による六次産業化が望まれる．地域創生が注目される中，地域特産物ブランド化と六次産業化に関する最近の動向について議論する．

3月18日（土）9:00〜12:00　C21会場（C校舎　4階　412）
世話人：浅尾浩史（奈良農研セ），田茂井政宏（近大農）
座　長：浅尾浩史（奈良農研セ），田茂井政宏（近大農）

9:00　はじめに……浅尾浩史（奈良農研セ）
9:05　2SY01–1　柿ポリフェノールの機能性……○米谷　俊（近大農）
9:35　2SY01–2　福井県産農産物の機能性研究によるブランド強化への取組み
……○高橋正和[1]，村上　茂[1]，小林恭一[2]（[1]福井県大生物資源，[2]福井食品加工研）
10:05　2SY01–3　カプシノイドを含有するトウガラシ新品種の育成とその販売戦略……○西本登志（奈良農研セ）
10:35　2SY01–4　大阪特産野菜‘水なす’の安定生産技術と新しい加工食品の開発……○鈴木敏征（大阪環農水研）
11:05　2SY01–5　鳥取県境港市におけるベニズワイガニの有効活用と機能性食品……○高森吉守（甲陽ケミカル）
11:35　2SY01–6　機能性農作物を活用したエビデンスに基づくブランド構築……○後藤一寿（農研機構）

### 2SY02　農芸化学から発信する次世代型天然物化学

これまで天然物化学の研究成果によって多くの有用物質が世に送り出され，人類の繁栄に貢献してきた．従来型の天然物化学研究はその目的と実験順序において単離・構造決定，全合成・構造活性相関そして生合成であった．ところが，昨今の分子遺伝学の進歩，次世代シーケンサー技術の発達，ケミカルバイオロジー研究等の進展に伴って，現在では，この順序及び深層は変貌し，異分野融合が必須になりつつある．

しかし，学術的にも実用的にも有機化学の正確な知識と判断力が，次世代型天然物化学の向性を担っていることはいうまでもない．そこで，本シンポジウムでは，有機化学に立脚し，合成生物学及びケカルバイオロジー分野で活躍中の先生方により最新の研究成果を織り交ぜながら，次世代型天然物化学展望について議論する場にする予定である．

共　催：新学術領域研究（研究領域提案型）平成28〜32年度 「生合成リデザイン」
3月18日（土）9:00〜12:00　C22会場（C校舎　5階　501）
世話人：渡辺賢二（静岡県大），掛谷秀昭（京大院薬）
座　長：渡辺賢二（静岡県大），掛谷秀昭（京大院薬）

9:05　2SY02–1　**Mechanisms of Cyclic Ether Formation in Fungal Natural Product Biosynthesis**
……○Yi Tang（University of California, Los Angeles）
9:35　2SY02–2　生体内合成化学治療……○田中克典[1,2,3]（[1]理研，[2]カザン大，[3]JSTさきがけ）
10:05　2SY02–3　**4-methyloxazoline**環を有する非リボソームペプチドの生合成…勝山陽平，○大西康夫（東大院農生科）
10:35　2SY02–4　電位依存性ナトリウムチャネル阻害剤サキシトキシンの化学……○長澤和夫（東農工大）
11:05　2SY02–5　複雑骨格天然物の生合成マシナリーの解明と再設計……○阿部郁朗（東大院薬）
11:35　2SY02–6　アカデミア創薬における表現型スクリーニングと次世代型天然物化学……○掛谷秀昭（京大院薬）

## 2SY03　生命系有機化学研究の進歩－全合成，生命機能の解明，創薬

近年，農芸化学を含む生命科学分野の進歩は目覚ましい．有機化合物の単離・構造決定，合成，誘導体化，構造活性相関の解明から生命機能解明のためのプローブ開発などのケミカルバイオロジー研究，さらにはバイオミメティックケミストリー，創薬など，有機化学関連分野も大いに貢献している．本シンポジウムでは，有機合成・生物有機化学など各方面でご活躍の先生方に最近の研究成果をご披露いただき，農芸化学分野における有機化学研究の将来像，今後の方向性などについて考えてみたい．

3 月 18 日（土）14:00～17:00　C16 会場（C 校舎　3 階　311）
世話人：谷森紳治（阪府大院生命環境），倉持幸司（東理大理工），園田素啓（阪府大院生命環境）
座　長：谷森紳治（阪府大院生命環境），倉持幸司（東理大理工），園田素啓（阪府大院生命環境）

14:00　2SY03–1　特異な環状構造を有する生物活性天然物の全合成
……佐藤俊太郎，福田裕紀，倉沢一輝，塚口頌悟，小倉由資，榎本　賢，○桑原重文（東北大院農）
14:35　2SY03–2　プロトイルダン型セスキテルペンの合成研究……○高須清誠（京大院薬）
15:10　2SY03–3　ミトコンドリア呼吸鎖複合体-I のキノン結合ポケットの特性……○三芳秀人（京大院農）
15:45　2SY03–4　生体高分子と遷移金属錯体からなる超分子の機能化……○山口浩靖（阪大院理）
16:20　2SY03–5　他の人には見えないものを見て研究しよう！……○大類　洋（横浜薬大）

## 2SY04　栄養食品成分の吸収と排出～膜を超える仕組み

生物が食品から栄養を取り込む機能は，生命の維持にとって必須である．この栄養食品成分の吸収は，生体内の様々なトランスポーターやチャネル（輸送体）により担われている．一部の輸送体は栄養成分の排出を行っており，輸送体は生体における栄養成分の出入り口としての役割を持つ．したがって，栄養吸収・排出機構の理解には，輸送体分子機能の理解が不可欠である．膜タンパク質である輸送体分子の研究は困難であったが，分子・生体レベルでの解析が進み，それを基に栄養吸収・排出機構の全体像が徐々に明らかになりつつある．本シンポジウムでは，農学・医学・栄養学などの領域にて輸送体研究を行う，新進気鋭の研究者らによる最新の研究成果を報告し，栄養食品成分の吸収・排出機構全体像の解明に向け，分野を超え，討議を行う．さらには輸送機構の理解に基づいた応用展開，機能性食品成分や人工甘味料等の栄養吸収への影響についても議論したい．

3 月 18 日（土）14:00～17:00　C21 会場（C 校舎　4 階　412）
世話人：永森收志（阪大院医），薩　秀夫（前工大工）
座　長：永森收志（阪大院医），薩　秀夫（前工大工）

14:00　はじめに……薩　秀夫（前工大工）
14:02　2SY04–1　**Cellular delivery of B vitamins and lipoic acid by sodium/multivitamin transporter SMVT**
……○Pattama Wiriyasermkul（Columbia Univ.）
14:27　2SY04–2　コレステロールおよび胆汁酸の腸管吸収機構と食品成分によるその制御……○小林彰子（東大院農生科）
14:57　2SY04–3　フィトケミカルによるグルコーストランスポーターの制御・調節……○薩　秀夫（前工大工）
15:27　2SY04–4　消化管リン輸送機構の役割……○瀬川博子，宮本賢一（徳島大院医歯薬）
15:57　2SY04–5　栄養食品成分の吸収・排出を担う膜輸送体の網羅的定量プロテオミクスによる変動解析
……○永森收志（阪大院医）
16:27　2SY04–6　タイトジャンクション構成タンパク質クローディンが規定する生体微小環境恒常性と消化管機能
……○田村　淳[1,2]，田中啓雄[2]，高橋信之[3]，月田早智子[1,2]（[1]阪大院生命，[2]阪大院医，[3]東京農大）
16:57　おわりに……永森收志（阪大院医）

## 2SY05 「応用微生物学」最新事情 ～探索から育種まで～

大村智先生のご研究に代表される有用微生物の探索・育種技術は，我が国が世界を牽引してきた．また，解析技術の向上により，ゲノムから遺伝子発現，タンパク質，代謝産物までの経時変化を追跡することで，生合成経路の設計や新規反応の創成が可能になりつつある．一方，バイオ燃料，医薬品，化学品素材などの微生物生産においては，期待した成果が上がっていないとの認識もある．そこで，我が国の応用微生物学の再興には，最新の要素技術を見極め，新しい発想に立脚した研究開発が必要である．また，合成生物学による微生物改良のみならず，ゲノム解析技術を活用した探索・育種への回帰も大切なアプローチである．以上の観点から，有用微生物の探索技術としてメタゲノム，未利用微生物，混合培養系をキーワードにし，また育種技術として実験室進化や古典的育種とゲノム解析手法を組合せた高機能開発にフォーカスし，本シンポジウムを企画する．

共　催：バイオインダストリー協会
3 月 18 日（土）14:00～17:00　C22 会場（C 校舎　5 階　501）
世話人：高木博史（奈良先端大バイオ），穴澤秀治（バイオインダストリー協会）
座　長：松下一信（山口大院創成科学），高木博史（奈良先端大バイオ），穴澤秀治（バイオインダストリー協会）

14:00　はじめに …… 高木博史（奈良先端大バイオ）
14:06　2SY05–1　アミノ酸の代謝制御と生理機能に基づく酵母の高機能開発 …… ○高木博史（奈良先端大バイオ）
14:34　2SY05–2　イオンビーム育種による新規発酵プロセスのための高機能糸状菌の開発
…… ○星野一宏[1]，高野真希[1]，畑下昌範[2]（[1]富大理工，[2]若狭エネ研）
15:02　2SY05–3　実験室進化・適応育種に基づく耐熱性機構の解析と高温発酵系の開発
…… ○松下一信[1,2]（[1]山口大農，[2]山口大中高温微セ）
15:30　2SY05–4　有用微生物酵素の探索と物質生産プロセスへの展開 …… ○木野邦器（早大先進理工）
15:58　2SY05–5　微生物の分離培養の限界とその克服をめざして …… ○鎌形洋一[1,2]（[1]産総研，[2]北大農）
16:26　2SY05–6　大規模天然物ライブラリーによるスクリーニングと新しい微生物二次代謝産物生産法の開発
…… ○新家一男[1]，池田治生[2]（[1]産総研，[2]北里大）
16:55　おわりに …… 穴澤秀治（バイオインダストリー協会）

## 3 月 19 日（日）9:00～12:00，または 14:00～17:00

## 3SY01　ストリゴラクトン研究の最前線から見える根寄生雑草防除の未来

ストライガやオロバンキに代表される根寄生植物は，主な作物に寄生して養水分を奪う難防除性の強害雑草であり，アフリカや中東，ヨーロッパ，北アフリカを中心として世界的に農作物に大きな被害を与えている．これら根寄生植物は宿主植物の根から分泌されるストリゴラクトンを感知して発芽する．ストリゴラクトンはカロテノイドから生合成されるテルペノイドであり，植物ホルモンやアーバスキュラー菌根菌に対する共生シグナルとしても働く．近年，特に日本の研究者により，ストリゴラクトンの生合成やホルモン機能，植物および根寄生植物での受容機構が解明されると共に，それらをターゲットとした根寄生植物の防除に有効なケミカルが開発されている．本シンポジウムでは，これらの研究成果を挙げられた方々に最新の話題を提供していただき，ストリゴラクトン研究を基軸とした根寄生植物の化学防除の展望について議論したい．

3 月 19 日（日）9:00～12:00　C21 会場（C 校舎　4 階　412）
世話人：秋山康紀（阪府大院生命環境），米山弘一（宇都宮大バイオ）
座　長：秋山康紀（阪府大院生命環境），米山弘一（宇都宮大バイオ）

9:00　3SY01–1　ストリゴラクトン－ジベレリン間クロストークとその応用　中村英光，○浅見忠男（東大院農生科）
9:30　3SY01–2　根寄生雑草の種子発芽刺激物質の化学と自殺発芽誘導への応用
…… ○杉本幸裕[1,2]，滝川浩郷[1,2]（[1]神大院農，[2]JICA/JST SATREPS）
10:00　3SY01–3　ストリゴラクトンの生合成と制御 …… ○山口信次郎（東北大院生命）
10:30　3SY01–4　**MAX1 と LBO により導かれるストリゴラクトン生合成経路**
…… ○野村崇人[1]，米山香織[1]，森　愛実[2]，謝　肖男[1]，秋山康紀[2]，米山弘一[1]
（[1]宇都宮大バイオ，[2]阪府大院生命環境）
11:00　3SY01–5　寄生植物ストライガのストリゴラクトン受容体を制御する人口アゴニストの開発
…… ○土屋雄一朗，浦口大輔，Satiyanarayanan AM，桑田啓子，吉村柾彦，萩原伸也，伊丹健一郎，大井貴史，木下俊則
（名大 ITbM）
11:30　3SY01–6　**New Insights into Carlactone Biosynthesis and Application**
…… Xiujie Guo[1], Mark Bruno[2], Sophia L. Samodelov[2], Lina Baz[1], Jamil Mohammed[1], Boubacar Kountche[1], Kun-Peng Jia[1], Valentine Ntui[1], Sandro Ghisla[3], Tadao Asami[4], Matias D. Zurbriggen[2], ○Salim Al-Babili[1]
([1]KAUST, [2]Univ. Düsseldorf, [3]Univ. Konstanz, [4]Univ. Tokyo)

## 3SY02　腸管免疫の一端を切り開く（腸内免疫系と腸内フローラ）

摂取した食品から栄養を効率良く吸収するために絨毛という形態が発達した腸管は，表面積の増加に伴ってさまざまな物質と接する機会も増え，その相互作用の影響を受けることが考えられる．特に，1000 種類もの腸内細菌が常に接している環境は，免疫細胞の分化や増殖の誘導など自然免疫系の活性の制御のみならず，宿主の生理機能に大きな影響を与えていることが明らかになってきた．そこで，腸管免疫が果たす役割の一端を垣間見るべく，腸管上皮細胞と相互作用する物質の生理機能への影響や腸内細菌叢（腸内フローラ）と腸管免疫との関係について，そのメカニズムを中心に議論したい．

3 月 19 日（日）9:00〜12:00　C22 会場（C 校舎　5 階　501）
世話人：矢部富雄（岐阜大応生科），田之上大（理研 IMS）
座　長：矢部富雄（岐阜大応生科），田之上大（理研 IMS）

9:00　はじめに……田之上大（理研 IMS）
9:05　3SY02–1　腸管免疫へのプロローグ：食物繊維と腸管構成細胞との相互作用……○矢部富雄（岐阜大応生科）
9:35　3SY02–2　腸管上皮細胞の $\alpha$**1, 2-**フコシル化は免疫細胞によって調節される
……○後藤義幸[1,2]（[1]千葉大真菌，[2]東大医科研）
10:05　休憩
10:15　3SY02–3　腸内細菌による **T** 細胞誘導……○田之上大[1,2]（[1]理研 IMS，[2]慶應大）
10:45　3SY02–4　腸管炎症抑制における膜型 **ATP** 分解酵素の役割
……○香山尚子，竹田　潔（阪大院医）
11:15　3SY02–5　腸内環境から考えるヘルスサイエンスの最前線
……○國澤　純[1,2,3,4]（[1]医薬健栄研，[2]東大医科研，[3]阪大医・薬・歯，[4]神戸大医）
11:45　おわりに……矢部富雄（岐阜大応生科）

## 3SY03　伝統的発酵食品の生理機能の新展開

和食の特徴として，多様で新鮮な食材の持ち味を生かした健康栄養バランスが優れた食事である点が挙げられる．このような健康的な食生活によって，現在日本は世界に冠たる長寿国となっている．日本人の長寿の要因として様々な食事成分が関わっていると考えられるが，和食の良さを科学的に示す生理活性本体について明らかにして行くことが求められている．

本シンポジウムでは，和食の中でも伝統的発酵食品から新たな視点で生理活性成分を探索・単離し，その生理機能を細胞・個体において検証している研究成果や日本の伝統的な食品の良さを科学的に検証している研究成果をご講演いただくことを企画している．脳機能・エピジェネティクスを含め幅広い範囲の研究成果を発表していただくことにしている．

3 月 19 日（日）14:00〜17:00　C16 会場（C 校舎　3 階　311）
世話人：増田誠司（京大院生命），中尾洋一（早大先進理工）
座　長：増田誠司（京大院生命），中尾洋一（早大先進理工）

14:00　はじめに……増田誠司（京大院生命）
14:05　3SY03–1　食品因子センシングからみた日本食素材の機能性……○立花宏文（九大農）
14:30　3SY03–2　清酒酵母の新しい機能 －睡眠の質改善作用－……○物井則幸（ライオン㈱機能食研）
14:55　3SY03–3　食品の香り・フレーバー研究の農芸“脳”科学……○岡本雅子，東原和成（東大院農生科）
15:20　3SY03–4　和食を支えるだしの秘密に迫る〜おいしさ，健康，そして食育へ〜……○近藤高史（味の素㈱イノベ研）
15:45　3SY03–5　慢性拘束ストレス負荷による脳機能低下に対する味噌摂取による改善効果……○瀬尾　誠（福山大薬）
16:10　3SY03–6　伝統的発酵食品の亜鉛欠乏予防効果 －有用因子の探索と同定－……○神戸大朋（京大院生命）
16:35　3SY03–7　味噌に含まれる抗ストレス成分の探索
……中村文彬[1]，川村　緑[1]，田中万結[1]，石橋信宏[1]，相馬里奈[1]，波多野絢香[1]，
坂本　匠[1]，上杉愛海[2]，菊水健史[2]，新井大祐[1]，塩田邦郎[1]，○中尾洋一[1]
（[1]早大先進理工，[2]麻布大学）

## 3SY04　マルチオミックスが開く新しい実用植物の特化代謝研究

昨今の植物機能性成分に対する世界的なトレンドを踏まえ，植物の特化代謝（二次代謝）を取り上げます．植物特化学分野で研究対象とされる多くの非モデル植物には充実したデータベースがありませんが，逆にそうした植物種にこそ人類に有用な成分を作る能力があります．

そのような実用植物の二次代謝研究で，現在技術論的にメインストリームを作っているオミックス技術を，さらに複数組み合わせた「マルチオミックス」を駆使してどこまでのことができるのか，何がわかるのか，を紹介したいと思います．

RNA-Seq やプロテオミクスなど，オミックスデータを取ったはいいけど，さてどう活用したら良いかわからない，という農芸化学会員は多分少なくないと思います．こうした（迷える）学会員たちの指針となることが期待できるシンポジウムとしたいと思っています．

3 月 19 日（日）14:00〜17:00　C21 会場（C 校舎　4 階　412）
世話人：矢崎一史（京大生存研），北島佐紀人（京工繊大院工芸科学）
座　長：矢崎一史（京大生存研），北島佐紀人（京工繊大院工芸科学）

14:00　はじめに……矢崎一史（京大生存研）
14:05　3SY04–1　植物代謝成分の有用性解明に向けたマルチオミクス解析の方向性
……○櫻井　望，柴田大輔（かずさ DNA 研究所）
14:40　3SY04–2　アスパラガスにおける含硫黄代謝物アスパラプチンの生合成機構の解明に向けた統合メタボロミクス
……○中林　亮（理研 CSRS）
15:15　3SY04–3　植物トリテルペノイド生合成とその制御機構……○關　　光（阪大院工）
15:50　3SY04–4　植物ステロイドサポニン生合成の解析と植物代謝工学……○水谷正治（神戸大院農）
16:25　3SY04–5　ムラサキのシコニン生産誘導系を用いたオミックス解析……○矢崎一史（京大生存研）
16:57　おわりに……北島佐紀人（京工繊大院工芸科学）

## 3SY05　ゲノム編集技術の実用化への期待と課題

ZFN や TALEN，CRISPR-Cas と様々なゲノム編集技術が開発され，糸状菌，トラフグ，ニワトリ，カイコ等，多くの生物種での成功例が見られるようになった．また，最近になって，デアミナーゼを利用した DNA を切断しない日本発のゲノム編集技術 TargetAID が開発された．このようなゲノム編集の技術的側面からのご講演に加えて，CRISPR/Cas9 の知的財産の現況はどうなっているのか，ゲノム編集により作出された生物は組換え生物なのかといった幅広い視点から，その分野の専門家を演者にお招きし，討論したいと考えている．

3 月 19 日（日）14:00〜17:00　C22 会場（C 校舎　5 階　501）
世話人：柴田　孝（アステラス製薬），坂元雄二（バイオインダストリー協会）
座　長：柴田　孝（アステラス製薬），坂元雄二（バイオインダストリー協会）

14:00　はじめに……柴田　孝（アステラス製薬㈱）
14:02　3SY05–1　ゲノム編集の原理と農芸化学・育種分野への可能性……○村中俊哉（阪大院工）
14:37　3SY05–2　塩基変換による切らないゲノム編集
……○西田敬二[1]，荒添貴之[1]，坂野聡美[1]，近藤昭彦[1,2]（[1]神戸大院イノベ，[2]神戸大院工）
15:12　3SY05–3　ゲノム編集技術に関する特許の最近の話題……○塚原優子（平木国際特許事務所）
15:47　3SY05–4　ゲノム編集など新たな育種技術をめぐる規制動向……○立川雅司（茨城大農）
16:22　3SY05–5　**CRISPR-Cas Enabled Plant Breedging**……○Mieko KASAI（DuPont Production Agriscience K.K.）
16:57　おわりに……坂元雄二（バイオインダストリー協会）

## 3月20日（月）9:00〜12:00

### 4SY01　美・生物の構造と機能を支える酵素と生体分子

農芸化学は生物および生物機能の有用性を探求する学問体系を構築しながら今日まで発展してきた．そのような生物は概して構造美や機能美をも有している．本シンポジウムでは，有用性にもつながる「生物や生体分子の構造美・機能美」にスポットライトを当てたい．細胞や個体群は，あるときはグロテスクに，あるときはエレガントにその構造美を映しだす．有用な機能が内包された酵素や生体高分子には，分子進化の過程が刻み込まれた構造美が見いだされる．生物や生体分子の構造美を鑑賞しつつ，機能とメカニズムに迫りたい．

3月20日（月）9:00〜12:00　C16会場（C校舎　3階　311）
世話人：田村　隆（岡山大院環境生命），岩坂正和（広島大RNBS）
座　長：田村　隆（岡山大院環境生命），岩坂正和（広島大RNBS）

9:00　4SY01–1　バイオミメティクスと生体由来反磁性微小結晶の磁気マニピュレーション法
……◦水川友里[1,2]（[1]広島大先端物質，[2]日本学術振興会）
9:25　4SY01–2　真正粘菌に学ぶ生物の適応ネットワーク理論……◦手老篤史（九大IMI）
9:50　4SY01–3　円石藻：二億年天然微細石灰彫刻……◦遠藤博寿（筑波大院生命環境）
10:15　4SY01–4　生体分子磁気応答の高感度検出に関わる一手法……◦岩坂正和[1,2]（[1]広大RNBS，[2]JST CREST）
10:40　4SY01–5　細菌におけるエイコサペンタエン酸の生理機能
……◦栗原達夫，川本　純，渡辺文太，小川拓哉（京大化研）
11:05　4SY01–6　セレン含有型ヒドロゲナーゼの美しき分子進化……◦田村　隆（岡山大院環境生命）
11:30　4SY01–7　タンパク質の美しき電子の世界……◦佐藤文俊，平野敏行（東大生研）

### 4SY02　新たにわかってきた植物をめぐる生物間相互作用－種とメカニズムの多様性を基盤とした産業利用への展開－

農業生態系においては植物をめぐり，様々な正と負の生物間相互作用が展開されている．本シンポジウムでは，明らかになりつつある植物と多様な生物種との相互作用，ならびに，その多様なメカニズムから，作物の収量増産に向けて新たなターゲット・アプローチを探りたい．植物－病原性微生物，植物－寄生動植物，植物－生長促進微生物，で展開される生物間相互作用について，有機化学，宿主となる植物および生理学の立場から産業利用を将来の視野に入れて研究を展開するシンポジストを招き，従来の枠組みでは実現し得なかった組み合わせでシンポジウムを実施する．生物間相互作用のメカニズムの解明と利用，および異分野連携を通じ新規な化合物や生物資材開発の可能性など，分野横断的な議論を活性化する．

3月20日（月）9:00〜12:00　C21会場（C校舎　4階　412）
世話人：清水伸泰（京都学園大バイオ環境），山下真生（日本農薬㈱総合研）
座　長：山下真生（日本農薬㈱総合研），石原　亨（鳥取大農），清水伸泰（京都学園大バイオ環境）

9:00　4SY02–1　植物感染性線虫の誘引物質の探索
…… 大田守浩，ツァイアレン，鈴木れいら，島岡知恵，石田喬志，◦澤進一郎（熊本大理）
9:30　4SY02–2　植物免疫活性化剤「プラントアクティベーター」の可能性と課題……◦山下真生（日本農薬㈱総合研）
10:00　4SY02–3　イネ科植物における二次代謝多様性の進化……◦石原　亨（鳥取大農）
10:30　4SY02–4　植物の生長を促進する葉面微生物の植物共生メカニズム
……◦阪井康能，由里本博也（京大院農）
11:00　4SY02–5　**RNA**を介した生物間相互作用を用いた新奇害虫防除法の開発
……◦佐藤　豊[1]，吉岡博文[2]，新美輝幸[3]（[1]遺伝研，[2]名大院生命農，[3]基生研）
11:30　4SY02–6　根寄生雑草に特徴的な代謝経路の同定と選択的除草剤への展開……◦岡澤敦司（阪府大院生命環境）

## 4SY03　農芸化学分野におけるエピジェネティクス研究

エピジェネティクスは，ゲノムに記された，遺伝情報の発現を制御するしくみであり，様々な生命現象と密接に関連する．DNAの配列変化を伴わない遺伝子発現制御に基づく遺伝学であり，ポストゲノム時代の重要な研究テーマである．生物種に関わらない普遍的生命現象，化合物，技術を対象とテーマとして農芸化学分野におけるエピジェネティクス研究を広く取り上げる．

共同主催：日本学術会議 農学委員会・食料科学委員会合同 農芸化学分科会
3 月 20 日（月）9:00〜12:00　C22 会場（C 校舎　5 階　501）
世話人：亀井康富（京府大生命環境），加藤久典（東大総括プロ）
座　長：亀井康富（京府大生命環境），加藤久典（東大総括プロ）

9:00　4SY03–1　**DNA メチル化による遺伝子発現調節を介した代謝制御**……○亀井康富（京府大生命環境）

9:30　4SY03–2　**アリルごとの DNA メチル化状態に注目したエピジェネティクス研究の新たな試み**
……○大鐘　潤[1]，新井良和[2]（[1]明治大農，[2]宮崎大農）

10:00　4SY03–3　**ヒドロキシメチルシトシン，メチルシトシンの新しい解析手法とその応用**
……○幸田　尚（東京医歯大難研）

10:30　4SY03–4　**優劣性を制御する低分子 RNA**……○高山誠司[1,2]（[1]東大院農生科，[2]奈良先端大バイオ）

11:00　4SY03–5　**エピゲノム創薬を目指したヒストン修飾のリアルタイムイメージング**
……○吉田　稔（理研環境資源セ）

11:30　4SY03–6　**妊娠中のタンパク質栄養と成長後の血圧をつなぐエピジェネティック制御**
……○加藤久典，三好　萌，斉藤憲司，大谷りら（東大総括プロ）

講演番号：2SY01-1
講演日時、会場：3 月 18 日 09:05～ C21 会場

# 柿ポリフェノールの機能性

# Polyphenols from persimmon fruits as a functional foods material

○米谷 俊（近大農）
○Takashi Kometani (Kindai Univ.)

柿は、古くから日本人に好まれている果物であり、主として生食や干し柿で消費されているが、ジュースやジャムなどの加工品の製造は限定的である。したがって、規格外品などが大量に廃棄され、生産者の意欲をそぐ一因となっている。そこで、生理機能に富むポリフェノール（タンニン）に着目し、急増する糖尿病に対応する機能性食品の開発を目指し、柿ポリフェノールの食後血糖値の改善作用について研究した。また、奈良県と和歌山県は、この隣接する地域で全国生産高の約 1/3 を占める柿の大生産地であり、柿の有効利用が進めば、地域の活性化にも繋がると考えられた。

柿ポリフェノールは、果実を脱渋後、粉砕し、熱水抽出して得た（園芸学研究、9, 367-372(2010)）。これをチオール分解し、HPLC/MS を用いて分析したところ、epicatechin：epicatechin gallate：epigallocatechin：epigallocatechin gallate＝1：1：3：2 の構成比を持つことが明らかとなった。

まず、Sprague Dawley（SD）ラットを用い、単回経口投与試験を実施した（8 週齢のラットにはマルトース負荷を、10 週齢のものにはグルコース負荷を実施）。その結果、両試験共に、柿ポリフェノール投与群（250 および 500 mg/kg 体重群）は、対照群に比べ、血糖値、血漿インスリン値が有意に低下した。柿ポリフェノールには、*in vitro* でα-アミラーゼ、マルターゼなどへの阻害活性が確認できたことから、消化酵素（糖質分解酵素）を阻害して、血糖値や血漿インスリン値の上昇を抑制したと考えられた。また、小腸のモデル細胞として知られる Caco-2 細胞を用いて、グルコースの取り込みを検討したところ、柿ポリフェノールは、腸管からのグルコースの吸収を抑制すると考えられた。

そこで、20 歳代の健常なヒトボランティア（n=10）を用いて、37.5 g マルトース（150 kcal）と共に 3 g の柿ポリフェノールを経口摂取させたところ、プラセボに比べて有意に血糖上昇を抑制した。

一般に、柿は 2～3%のポリフェノールを含むことが報告されているので、100～200 g の柿を摂取すると、2～6 g の柿ポリフェノールを摂取していることになり、食経験上も安全であると考えられた。

ポリフェノールは、苦味や収斂味を持ち、これが飲食の妨げとなることが多いため、クッキーに柿ポリフェノールを 1～3%添加したものを試作し、官能評価した。その結果、若干の苦味や収斂味は感じるものの、クッキーとしてのおいしさ評価ではプラセボと有意差はなかった。

以上の結果から、柿ポリフェノールは、糖質の消化と吸収を抑制し、食後血糖値の上昇を抑制することが明らかとなった。さらに、官能評価でも良好な結果が得られたので、地元企業と共に実用化に向けて研究開発を進めている。

polyphenol, persimmon, hyperglycemic

発表責任者：米谷俊（komet03242@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：2SY01-2
講演日時、会場：3 月 18 日 09:35～ C21 会場

# 福井県産農産物の機能性研究によるブランド強化への取組み

# Functional Research and Strengthening the Brand Power of Agricultural Products in Fukui

○高橋 正和[1]、村上 茂[1]、小林 恭一[2] ([1]福井県大・生物資源、[2]福井県食品加工研究所)
○Masakazu TAKAHASHI[1], Shigeru MURAKAMI[1], Kyoichi KOBAYASHI[2] ([1]Fukui Pref. Univ., [2]Fukui Pref. Food Process. Res. Inst.)

がんや血管疾患など日本人の死因の上位を占める生活習慣病には、基盤病態として慢性炎症が関与しており、肥満による高血圧・脂質代謝異常・糖質代謝異常などの代謝性疾患の発症・増悪に深く関わっている。実際、食細胞による活性酸素・フリーラジカルの慢性炎症局所における持続的過剰産生は、各種の炎症性疾患・生活習慣病の発症リスクを高めることが知られ、また抗炎症性食成分の摂取には、発症リスクの低減効果が期待される。今回は、我々が取組んできた福井県産農産物に関する解析事例と、機能成分の効率的濃縮・強化法についてご紹介したい。

【伝統野菜・特産作物の解析】

福井県では「伝統野菜」（長年にわたり栽培農家自身の手で種子の自家採取が行われてきた品種）が県内各地で栽培されており、これまでに 20 品種余りが「伝統の福井野菜」に認定されている。我々は、このような伝統野菜を含む福井県の地域特産作物のブランド強化を目指して、これまでに各種作物抽出物について、培養細胞評価系や実験動物評価系を利用して、ラジカル産生抑制効果、抗炎症・抗アレルギー効果、脂質代謝改善効果などの機能解析を行うとともに、機能成分の単離・同定などを検討してきた。このような機能性評価や有効成分の解析は、一般消費者に対して科学的根拠の提示を可能とし、各作物や加工品の付加価値ならびに科学的信頼性を高めることにつながる。その結果、生産農家には栽培意欲の向上を、食品加工メーカーには新商品開発意欲の機会を、そして消費者には購買意欲向上と商品選択の機会をもたらすきっかけになると期待される。

そこで、これまでに取組んできた機能解析・産官学共同研究事例の中から、実際に農家の六次産業化のきっかけにつながった事例を中心に紹介するとともに、これまでの取組の間に遭遇したいくつかの課題についても提供したい。

【機能成分の効率的濃縮・強化法について】

機能成分の含量は、作物やその加工品の有用性・有効性を左右する重要な要素である。機能成分量を高めるには、大きく次の 2 つのアプローチが考えられる。

（1）新品種開発や栽培法の改良による、素材作物自身の含量の向上
（2）加工法の工夫・開発による、機能成分濃度の強化

我々は、これまでに（2）のアプローチで機能成分濃度を高める手法を開発してきた。これについても若干の事例を紹介したい。

traditional edible plant, anti-inflammatory activity, active compound enrichment

発表責任者：高橋正和（mastak@fpu.ac.jp）

講演番号：2SY01-3
講演日時、会場：3 月 18 日 10:05～ C21 会場

# カプシノイドを含有するトウガラシ新品種の育成とその販売戦略

# A newly developed capsinoid-containing pepper cultivar, 'HC3-6-10-11', and its sales strategy

○西本 登志（奈良農研セ）
○Toshi NISHIMOTO (Nara Pref. Agric. Res. & Dev. Ctr.)

カプシノイドは，カプサイシノイドの 1000 分の 1 程度しか辛味を呈さないが，エネルギー代謝促進作用，体熱産生促進作用，脂肪代謝促進作用などの生理作用が認められており，トウガラシ品種‘CH-19 甘’において初めてその存在が確認された物質である．‘CH-19 甘’は，カプサイシノイドの生合成に関わる *pAMT*（*putative aminotransferase*）遺伝子に一塩基が付加されて機能欠損したために，カプシノイドを産生すると考えられている．

カプサイシノイド含有量がわずかでカプシノイドを高含有する‘CH-19 甘’は，カプシノイドを主成分とする健康食品等の原料として利用されているが，食味が悪いために食利用には不向きである．一方，奈良県在来の非辛味トウガラシ品種の‘ひも’は，一塩基置換により *pAMT* が機能欠損しており，カプシノイドを含有することが判明した．しかし，‘ひも’のカプシノイド含量は，4g 以上の果実では多いが，果皮が柔らかく食味が良い 2～3g の果実では少ない．

そこで，‘CH-19 甘’の育成者である矢澤 進 京都大学名誉教授，カプシノイドを主成分とする健康基盤食品を製造・販売する味の素株式会社および奈良県が協力して，‘ひも’と‘CH-19 甘’との後代から，カプサイシノイド含有量が安定し，食して美味しい固定種‘HC3-6-10-11’を選抜・育成し，品種登録出願した（出願番号 30271，2016 年 2 月 26 日に出願公表）．

‘HC3-6-10-11’は，果実重が 7g 程度であり収穫に手間がかかるため，ピーマンや大型のトウガラシと比較して高価格での販売が必要であること，また，固定種であるために採種による再生産が可能であることから，果実の販売先を，果実の最終消費が確認できる飲食店と，種子の発芽能力を失わせる加工を行う業者に限定して，生産者に対する栽培許諾を行っている．2016 年度は，4 法人が栽培に取り組み，10 経営体が果実の調理・加工販売を行った．生産販売経路は，①飲食店を営む生産法人の自社店舗利用，②飲食店を営む生産法人の自社店舗利用と飲食店への出荷，③生産法人から飲食店・加工業者への出荷，であり，飲食店は，日本料理店，イタリア料理店，フランス料理店，スムージー専門店などである．なお，‘HC3-6-10-11’の呼称は「やまと甘なんばん」と定めている．

Capsicum, nonpungent, capsiate

発表責任者：西本登志（nishimoto@naranougi.jp）

講演番号：2SY01-4
講演日時、会場：3 月 18 日 10:35～ C21 会場

# 大阪特産野菜‘水なす’の安定生産技術と新しい加工食品の開発

# Development of stable cultivation method and new processed foods of traditional eggplant cv.mizunasu in Osaka prefecture

○鈴木 敏征（大阪環農水研）
○Toshiyuki Suzuki (Res. Inst. Enviro., Agric. & Fish., Osaka Pref.)

大阪府泉州地域の特産野菜である‘水なす’は浅漬けにすると絶品であるにもかかわらず輸送性が乏しいため、消費が泉州地域のみに限られていた。しかし、生産者や加工業者らによる、生果や浅漬けの積極的なプロモーション、共選共販制度の導入による品質安定化および出荷箱の改良と統一等の努力により、近年では全国的に知られるようになっている。最近の栽培面積は 46ha、粗生産額は 10 億円以上、漬物加工を含めると総販売額は 30 億円以上で、首都圏での生果の売上金額も年々増加し、平成 27 年は 8,000 万円以上と推定されている。ここでは、大阪府立環境農林水産総合研究所が実施している‘水なす’安定生産技術や新しい加工食品開発に関する最近の取り組みについて紹介する。

１．安定生産技術開発の取り組み

（１）高温障害（つやなし果）の抑制

‘水なす’は一般的なナスに比べて水分を多く含み果皮が柔らかい特徴を持っている。そのため、高温期に果皮表面のつやが無くなり消炭のようになるつやなし果が多発し、ひどい時には収穫物の半数以上が出荷できない状況になる。そこで、細霧冷房によるつやなし果抑制技術について検討した。細霧冷房は水を高圧で噴霧し細霧を発生させることで、気化熱により温室内の気温を冷却する技術で、これにより栽培施設内の最高気温を 3℃以上低下させつやなし果の発生を 2 割以上減少させることが可能であった。

（２）低温期の収量増加

‘水なす’は春先（2～4 月）に高値で取引されるが、その時期の収量は少ない。そのため、炭酸ガス施用による増収技術について取り組みを開始している。

２．新しい加工食品開発の取り組み

研究所では、6 次産業化の一環として、府内で生産された 1 次産品を活用した商品の開発・改良などを行う事業者等を技術面から支援する事業（大阪産（もん）チャレンジ支援事業）を実施している。これまでも、‘水なす’の主要な加工食品であるの浅漬けに関する技術（退色防止や殺菌方法）を開発してきたが、この事業の中では‘水なす’を活用した新しい加工食品開発に取り組んでいる。現在までに、「水なす浅漬けのお茶漬けの素」、「水なすジャム」、「泉州水なす塩」、「ミニ水なすまるごとピクルス」、「水なすカクテルシロップ」および「水なすキムチスープ」の開発・改良を支援し、用途の拡大を図っている。

traditional eggplant, branding, sixth industrialization of agriculture, forestry and fisheries

発表責任者：鈴木 敏征（t.suzuki@mbox.kannousuiken-osaka.or.jp）

講演番号：2SY01-5
講演日時、会場：3 月 18 日 11:05～ C21 会場

# 鳥取県境港市におけるベニズワイガニの有効活用と機能性食品

# The utilization of chitin obtained from crab shell as functional foods and industrial materials in Sakaiminato City, Tottori Prefecture

○高森 吉守（甲陽ケミカル）
○Yoshimori Takamori (Koyo Chemical)

鳥取県はカニの水揚げ日本一を誇り、カニを使った食品の開発やカニ殻に含まれるキチン質の有効利用などの取り組みが進められてきた。県西部の境港市にはカニの加工を行う会社が集積しており、当社でも境港市内に製造工場を有し、地元で水揚げされ加工されたベニズワイガニの殻を原料に、キチン、キトサン、オリゴグルコサミン、グルコサミンなどの素材を製造販売している。

「カニ」および「カニ殻から抽出されるキチン、キトサン」は、鳥取県の地域資源として登録されているので、当社では経済産業省中国経産局の地域産業資源活用事業（課題名：『カニ殻から抽出される「キチン」「キトサン」を活用した高付加価値商品の製造・販売事業』）の認定を受けて、研究開発を行っている。

キチンは反応条件を制御することで任意の分子量や脱アセチル化度に調製することが可能で、それにより様々な物性を示すことから、応用範囲も多岐に渡っている。例えば、キチンを脱アセチル化して得られる高分子のキトサンは、水処理凝集材や抗菌繊維などの工業分野、土壌改良材などの農業分野、コレステロール低減作用を持つ健康食品素材としてなど食品分野等で、活用されている。

また、キチンを加水分解して得られるグルコサミンは、臨床試験において、関節軟骨保護作用[1)]や乾燥肌改善作用[2)]、血管内皮保護作用[3)]などの成績が報告されており、当社ではこれらのエビデンスを基に、関節や皮膚の健康維持をターゲットとした機能性表示食品への応用を進めている。

本シンポジウムでは、地域資源であるカニ由来のキチン、キトサンを出発とした素材について、当社の応用開発の取り組みや研究成果について紹介させていただく。

参考文献

1) Yoshimura M, Sakamoto K, Tsuruta A, Yamamoto T, Ishida K, Yamaguchi H, Nagaoka I: International Journal of Molecular Medicine, 24: 487-494, 2009.
2) 梶本修身、勝呂栞、高橋丈生：日本食品科学工学会誌、48(5)：335-343, 2001.
3) 加藤宏司、森田博彦、原田晴仁、新谷恵美子、坂本廣司、池田久雄:グルコサミン研究６:55-60, 2010.

chitin, glucosamine, Functional foods

発表責任者：高森　吉守（takamori@koyo-chemical.co.jp）

講演番号：2SY01-6
講演日時、会場：3 月 18 日 11:35～ C21 会場

# 機能性農作物を活用したエビデンスに基づくブランド構築
# Brand building based on evidence using functional agricultural products

○後藤 一寿（農研機構）
○Kazuhisa GOTO (NARO)

農業の抱える課題は、農業生産者の高齢化、篤農技術の消失、多発する異常気象、農産物価格の下落、輸入農産物の増加、耕作放棄地の増加などが挙げられ、農業を成長産業へするには多くの困難な課題がある。そのような中、農業の高付加価値化を目指し、六次産業化が進められている。六次産業化とは、農業生産者自らが、農業生産（一次産業）、加工事業（二次産業）、販売・サービス事業（三次産業）に進出し、農業経営の多角化を図ることで、総付加価値の最大化を目指す取り組みのことをいう。近年では、農業者と企業が連携し、付加価値を高める農商工連携なども同様の取り組みとして議論されている。強い農業を実現するため、農研機構をはじめ、全国の公設試験研究機関では、様々な角度から農業研究が進められている。例えば、農研機構では、機能性の高い新品種の育成から産業化までを一貫したフードバリューチェーンとしてとらえ研究を進めている。すなわち、多様な遺伝資源を活用した交配育種、収量や品質などの最適な条件を探る栽培研究、機能成分や栄養成分の含有量を測定する成分分析、機能性成分に対する機能性研究および安全性研究、産業支援を目指した加工技術研究、市場調査を中心としたマーケティング研究、農業生産者や加工企業と一緒に取り組む産地化商品化支援、そして地域経済の波及効果の検証を行う。これら一連のフードバリューチェーンに即した研究により、新品種を活用したブランド構築を進めている。これら一連のブランド構築のモデルとしてアントシアニンに着目した機能性農産物として「紫サツマイモ（アヤムラサキ、ムラサキマサリ）」「黒大豆（クロダマル）」を紹介する。紫サツマイモは色素用途としての開発に加え、飲料用途の開発、食品企業との共同研究などを通して、人介入試験を実施し、アントシアニンによる肝機能改善効果などを明らかにした。そのうえで、新たな加工用途の開発や全国消費者調査などを実施し、六次産業化を推進した。黒大豆クロダマルでは、機能性成分や抗酸化力測定、味分析などを通して機能性や味に関するエビデンスを収集・公開し、産地化と商品化を同時に実現した。また、新品種を活用した六次産業化の推進方策を明らかとし、具体的なステップを開発公開した。これらの事例に加え、機能性農産物に対して消費者がどのような意識を有しているのかを、いくつかの消費者調査結果について紹介する。本報告では、エビデンスに基づくブランド化のポイントとして、以下の４点を指摘したい。すなわち、１）フードバリューチェーンに即したエビデンスの蓄積と公開、２）ストーリーやパッケージなどのデザイン力、３）ステークスホルダーが共創的につながるチームの構築、４）商品力である。これらにより効果的に六次産業化が進められ、地域農業の活性化が図られることを期待する。

The sixth industrialization, Evidence based marketing, Functional agricultural products

発表責任者：後藤一寿（gotok@affrc.go.jp）

講演番号：2SY02-1
講演日時、会場：3 月 18 日 09:05～ C22 会場

# Mechanisms of Cyclic Ether Formation in Fungal Natural Product Biosynthesis

○Yi Tang (University of California, Los Angeles)

Natural products biosynthesized by filamentous fungi exhibit complex structures and exciting biological activities. Cyclic and multicyclic ethers are formed prevalently in biosynthesis of polyketides, terpenes and alkaloids, often through unexplored mechanisms. For example, aurovertin is a powerful ATP-synthase inhibitor and contains a 2,6-dioxabicyclo[3.2.1]octane ring that is derived from a polyene precursor; while the penigequinolone/aspoquinolone alkaloids contain cyclic ethers derived from novel cyclizations of a C10 terpene precursor. We have investigated the biosynthetic pathways of these natural products in detail and have mapped the enzymes and mechanisms of ether formation. In aurovertin biosynthesis, we showed that the iterative functions of a flavin-dependent monooxygenase and a hydrolase are responsible for oxidative formation of the bicyclooctane ring. We demonstrated that a tetrahydrofuranyl polyene is the first stable intermediate in the transformation, which can undergo epoxidation and anti-Baldwin 6-endo-tet ring opening. In the quinolone alkaloid pathways, we uncovered a new class of epoxide opening enzymes that have sequence homology to CrtC, which has not been implicated in epoxide rearrangement previously. The corresponding enzyme from Pen and Asp pathways catalyzes semipinacol and 3-*exo*-tet rearrangements, respectively, both of which are new to epoxide enzymology. Results from these biosynthetic investigations will be discussed in this talk.

natural product, biosynthesis, penigequinolone/aspoquinolone alkaloid

発表責任者：Tang Yi（yitang@ucla.edu）

講演番号：2SY02-2
講演日時、会場：3 月 18 日 09:35～ C22 会場

生体内合成化学治療
Therapeutic In Vivo Synthetic Chemistry
○田中 克典[1,2,3] ([1]理研、[2]カザン大、[3]JST さきがけ)
○Katsunori Tanaka[1,2,3] ([1]RIKEN, [2]Kazan Univ., [3]JST PREST)

発表者らは、天然物を代表とする生理活性分子を、生きている動物内で直接的に合成することにチャレンジしている。従来のように、活性を持つ分子を体内に導入して、がんなどの縮小効果を検討するのではなく、「生体内合成化学治療」と呼ぶ方法で、血中内や標的臓器上での反応や試薬開発を行い、ある時間枠にピンポイントで生理活性分子を直接動物内で合成して効果を発揮させる。活性や毒性のない原料や試薬を体内に導入して、体内の特定の場所で時空間的に生理活性分子を創製し治療する戦略である。本発表では、下記２つの戦略について紹介したい。

（１） 生体内の特定の臓器で金属触媒反応を行う戦略：
最近発表者らが開発した天然 N-型糖鎖クラスターによるデリバリーシステムを利用して、金属触媒を安定かつ迅速にマウス内の特定の臓器に担持した。これに対して反応試薬をマウス内に続けて導入することにより、望む臓器上で金属触媒反応を進行させることに初めて成功した。このように、生体内の特定部位で選択的に生理活性分子を合成する基礎を築いた。

（２）疾患部位で発生する毒性分子を生理活性分子へと生体内変換する戦略：
酸化ストレス疾患で発生するアクロレインの新規な反応性を幾つか開拓した。これらの反応は、実際に生体内で進行している「見過ごされてきた」天然に存在する反応であり、生体内での様々な機能調節に貢献している。そこで、これらの有機反応を特定の細胞上、血中、尿、あるいは生体内の疾患部位で選択的に実施することにより、アクロレインを検出プローブや活性分子へと変換することに成功した。生体内で直接疾患を可視化したり、治療するプローブを合成する有機合成化学分野からの新しい戦略である。幾つかの反応を活用して、既に治験や臨床研究を始めている。

これらの「生体内合成治療」の戦略により、従来のオフターゲティングや安定性の問題を解決し、分子を改めて見直し開発する化学、「分子ルネッサンス」を実現できるのではないかと考えている。

therapeutic in vivo synthetic chemistry, N-glycan, molecular renaissance

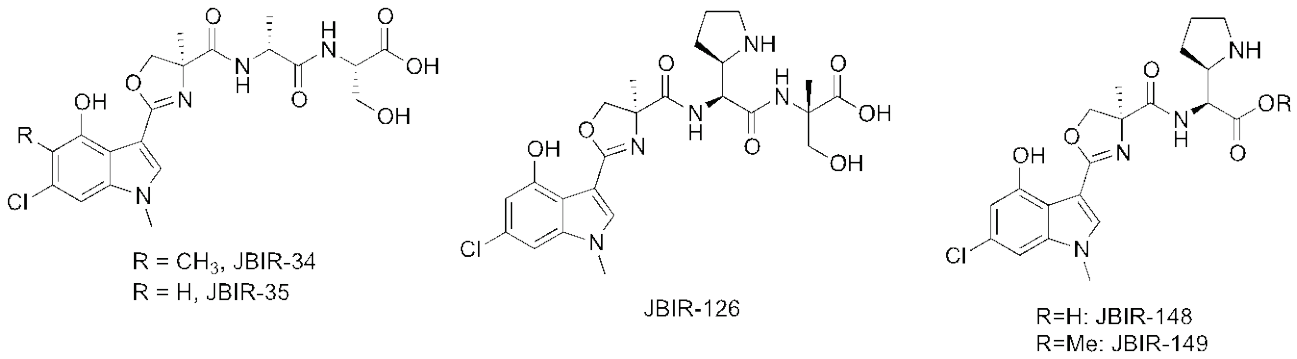
発表責任者：田中克典（kotzenori@riken.jp）

講演番号：2SY02-3
講演日時、会場：3 月 18 日 10:05～ C22 会場

# 4-methyloxazoline 環を有する非リボソームペプチドの生合成
# Biosynthesis of nonribosomal peptides containing 4-methyloxazoline

勝山 陽平、○大西 康夫（東大院農生科）
Yohei Katsuyama, ○Yasuo Ohnishi (Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., Univ. of Tokyo)

非リボソームペプチドはリボソームを経由せずに合成されるペプチドの総称であり、非リボソームペプチド合成酵素（NRPS）により生合成される。非リボソームペプチドは、微生物二次代謝産物の主要グループの 1 つを構成しており、医薬品資源として重要である。NRPS は複数のモジュールから構成される巨大なタンパク質である。モジュールは基本的に 3 つのドメイン（アデニル化ドメイン、チオール化ドメイン、縮合ドメイン）から構成され、特定のアミノ酸を用いてペプチド鎖を 1 つ伸長する反応を触媒する。NRPS はタンパク質合成に用いられる 20 種以外のアミノ酸も利用できる点が特徴的であり、これが NRP の構造多様性の一因にもなっている。NRPS が利用する非タンパク質性アミノ酸には、オルニチンのように一次代謝経路で用いられているものもあるが、その多くは独自の代謝経路を用いて生合成されるアミノ酸である。我々の研究室では JBIR-34, -35 及び JBIR-126, -148, -149（下図）に着目し、その生合成経路を解析してきた。JBIR-34, -35 は 4-methyloxazoline 環を有し、この環構造は alpha 位にメチル基をもつセリン由来である。[1,2] また、JBIR-126, -148, -149 は 4-methyloxazoline 環に加え、pyrrolidinylglycine をその構造中に有する。[3] これらの構造の生合成機構には不明な部分が多く、その解明は NRPS の触媒機能を理解する上で重要である。本講演では、これらの化合物の生合成に関する最新の研究成果を発表する。




JBIR-34, -35, -126, -148, -149 の構造

1) Motohashi et al. (2010) *J. Nat. Prod.* 73, 226.; 2) Muliandi et al. (2014) *Chem. Biol.* 21, 293.; 3) Izumikawa et al. (2015) *Tetrahedron Lett.* 56, 5333.

nonribosomal peptide synthetase, 4-methyloxazoline, pyrrolidinylglycine

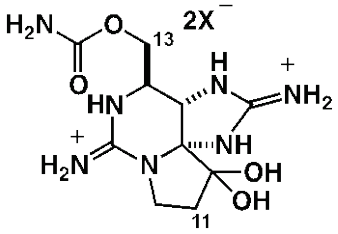
発表責任者：大西康夫（ayasuo@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2SY02-4
講演日時、会場：3 月 18 日 10:35～ C22 会場

# 電位依存性ナトリウムチャネル阻害剤サキシトキシンの化学
# Chemistries in saxitoxin, a voltage gated sodium channel inhibitor

○長澤 和夫（東京農工大学）
○Kazuo Nagasawa (Tokyo University of Agriculture and Technology)

グアニジン官能基を持つ天然物類は、フグ毒テトロドトキシンに代表されるように、強力な生物活性を有する場合が多い。これは、化合物中のグアニジン官能基とタンパク等の生体高分子との特異的な認識と相互作用に起因するためである。



サキシトキシン

私達の研究室ではこれまでに、麻痺性貝毒サキシトキシン類の合成に取り組んできた。サキシトキシンは、テトロドトキシンと同様、電位依存性ナトリウムチャネルを阻害することで強力な毒性を示す。電位依存性ナトリウムチャネルは神経細胞に広く発現しており、筋収縮、心拍、痛み等の重要な生命活動における活動電位を司る膜タンパク質である。これまでに 10 種のサブタイプが確認されており、これらは、テトロドトキシンに対する感受性の違いから、TTX-感受性型と TTX-抵抗型に大別される。サキシトキシンもテトロドトキシンと同様の感受性を示すことから、TTX-抵抗型チャネルに対して阻害活性は示さない。一方、TTX-抵抗型チャネルには、心筋、痛覚に関連するナトリウムチャネルが存在し、これらは重要な創薬標的として知られる。そこで私達は、サキシトキシン類の全合成、全合成を基盤とした構造展開による TTX-抵抗型チャネル阻害剤の創製を目的として、研究を行っている。

これまでに、アセチル基の隣接基関与を基盤としたサキシトキシンの有する三環性グアニジン骨格の構築法を開発した。本手法を基に、サキシトキシンおよびゴニオトキシン 3 等のサキシトキシン類縁体、また C13 位のカルバモイル基に着目した構造展開によるサキシトキシン誘導体類の合成を報告してきた[1-3]。また最近、C11 位に炭素−炭素結合を有する新規サキシトキシン類縁体である 11-サキシトキシン酢酸の全合成に成功した[4]。本稿では、これらサキシトキシン類の合成研究、および合成した化合物群の生物活性について紹介する。加えて、矢毒カエルから単離されたサキシトキシン類縁体ゼテキトキシン AB の合成研究に関する最新の研究成果を紹介する。

（参考文献）

1. O. Iwamoto, D. Hashizume, H. Koshino, K. Nagasawa, *Angew. Chem. Int. Ed., 46*, 8625 (2007). 2. O. Iwamoto, K. Nagasawa, *Org. Lett., 12*, 2150 (2010). 3. R. Shinohara, T. Akimoto, O. Iwamoto, T. Hirokawa, M. Yotsu-Yamashita, K. Yamaoka, K. Nagasawa, *Chem. Eur. J.*, *17*, 12144 (2011). 4. C. Wang, M. Oki, T. Nishikawa, D. Harada, M. Yotsu-Yamashita, K. Nagasawa, *Angew. Chem. Int. Ed., 55,* 11600 (2016).

saxitoxin, guanidine alkaloid, total synthesis

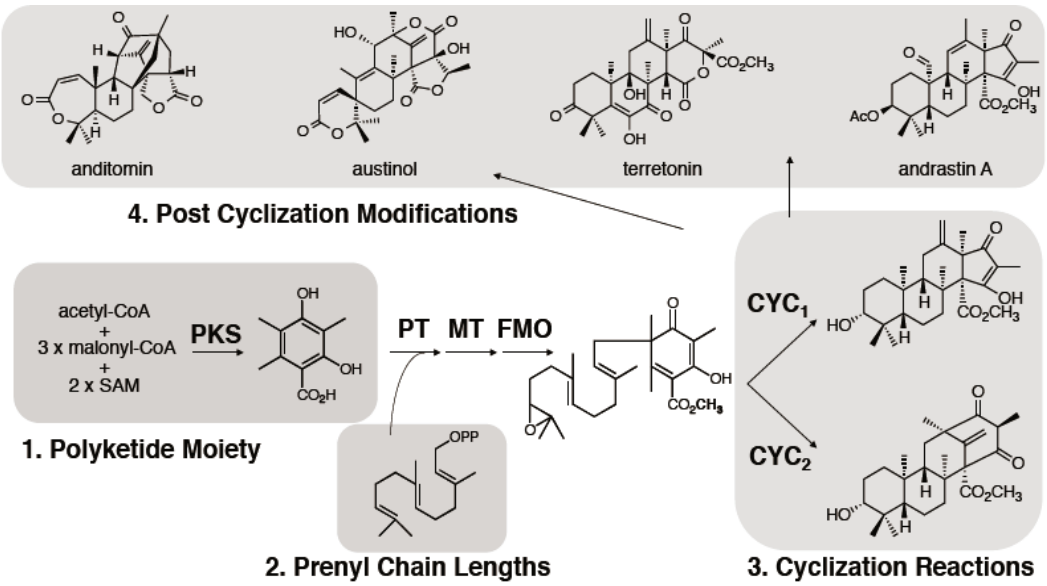
発表責任者：長澤和夫（knaga@cc.tuat.ac.jp）

講演番号：2SY02-5
講演日時、会場：3 月 18 日 11:05～ C22 会場

# 複雑骨格天然物の生合成マシナリーの解明と再設計
# Elucidation and Redesign of Biosynthetic Machineries of Complex Natural Products

○阿部 郁朗（東大院薬）
○Ikuro Abe (The Univ. Tokyo)

医薬資源として重要な天然物の骨格を構築する二次代謝酵素の中には、活性部位の微妙な構造の違いで基質特異性や反応様式が大きく変化するものがあり、これが天然物の分子多様性を生み出す大きな要因となっている。本講演では、ステロイドに匹敵する多様で重要な生物活性を有し、優れた医薬品シードとなる糸状菌由来メロテルペノイドの生合成をとりあげる。我々は数種のメロテルペノイドの生合成マシナリーを世界に先駆けて解明し、麹菌を宿主とする物質生産系の構築に成功している。その生合成遺伝子クラスターは 20-30 kb 程度、比較的コンパクトで扱いが容易であり、基本骨格構築を担うポリケタイドやテルペン合成酵素などに加え、さらなる分子の構造多様性を創出する種々の修飾酵素をコードしている。比較的短工程で複雑な分子骨格を構築する点が特徴的であり、これは多段階の劇的な骨格変換反応を触媒する多機能型酸化酵素の存在によるところが大きい。人為的な機能制御と分子多様性創出の格好の材料ともいえる、これら特異な反応を触媒する修飾酵素について、X線結晶構造解析などにより、酵素反応の立体構造基盤を解明し、さらに立体構造情報に基づき酵素機能を合理的な改変をめざした研究を精力的に展開している。生合成マシナリーの合理的再構築により、狙ったものを正確に作る、天然物を凌ぐ新規希少有用物質の大量安定供給を実現する、次世代天然物化学について、最近の研究成果を紹介する。




Engineered Biosynthesis, Enzyme Engineering, Natural Products Chemistry

発表責任者：阿部郁朗（abei@mol.f.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2SY02-6
講演日時、会場：3 月 18 日 11:35～ C22 会場

# アカデミア創薬における表現型スクリーニングと次世代型天然物化学

# Phenotypic screening and next-generation natural product chemistry towards academic drug discovery

○掛谷 秀昭（京大院薬）
○Hideaki Kakeya (Grad. Sch. Pharm. Sci., Kyoto Univ.)

疾患ゲノム解読や病原菌ゲノム解読などが次々に行われつつある現在、膨大なゲノム情報から多くの創薬標的が明らかになりつつある。アカデミアにおいてもこのような生命科学におけるビッグデータを創薬研究に活用するという“アカデミア創薬”の潮流が世界的にも押し寄せている。化学と生命科学（生物学）の学際融合研究領域であるケミカルバイオロジー研究は、アカデミア創薬研究においても創薬シーズの探索・開発、創薬標的の探索・同定、化合物プロファイリングなどの観点から非常に重要な地位を占めている。ケミカルバイオロジー研究の根幹を支えるのが、創薬シーズになりうる有用物質の開拓を担う“天然物化学領域”である。近年、*in vitro* スクリーニング技術の様々な進歩にも関わらず新薬開発は停滞しており、化合物が誘導する表現型を指標とした細胞レベルでの表現型スクリーニング（phenotypic screening）の重要性が再認識されつつある。本講演では、生体内微小環境シグナル（低酸素環境シグナル、生体膜シグナルなど）を標的とした表現型スクリーニングと微生物代謝産物及び微生物の複合培養系を活用した創薬シード分子開発研究について紹介する。

乳がんや腎がんなどの固形がん内部には低酸素環境が存在する。この低酸素ストレス応答を担っているのが低酸素誘導因子 HIFs（hypoxia-inducible factor 1-3 の総称)である。HIFs の主要サブユニット HIF-α の発現量と予後不良との相関が様々ながん種で報告されており、特に HIF-1α はがん化学療法の有望な分子標的として注目されている。そこで我々は、HIF-1α 活性化経路を治療標的とした表現型スクリーニング研究を展開し、放線菌 *Streptomyces* sp. KUSC-A08 が生産する verucopeptin を再発見し、創薬シーズとしての可能性を探求している。

一方、エルゴステロール生合成経路に変異を持つ分裂酵母 *Saccharomyces pombe* は、生体膜脂質と相互作用する化合物に対する感受性が野生株と比べて低下する。そこで我々は、野生株と *erg* 変異株の薬剤感受性差異を指標にした生体膜シグナル制御物質のスクリーニング研究を展開している。その過程で、*Streptomyces* sp. HEK616 と *Tsukamurella* sp. TP-0596 の複合培養系においてのみ生産される新規 5aTHQs（5-alkyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines）及び streptoaminals を見出し、生産機構や創薬シーズとしての可能性を探究している（尾仲宏康先生（東大院農）らとの共同研究)。

なお、表現型スクリーニングにより見出された生物活性物質の標的タンパク質（あるいは生体内物質など）の探索・同定プラットフォーム（5-SOxT（5-sulfonyl tetrazole)プローブ法及び TAL（thiourea-modified amphiphilic lipid）プローブ法）の開発についても紹介する。

chemical biology, natural product chemistry, phenotypic screening

発表責任者：掛谷秀昭（scseigyo-hisyo@pharm.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2SY03-1
講演日時、会場：3 月 18 日 14:00～ C16 会場

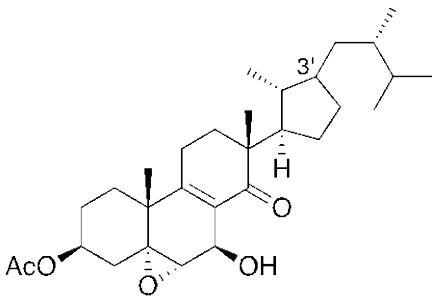
# 特異な環状構造を有する生物活性天然物の全合成
# Total synthesis of bioactive natural products with unique ring systems

佐藤 俊太郎、福田 裕紀、倉沢 一輝、塚口 頌悟、小倉 由資、榎本 賢、○桑原 重文（東北大院農）
Shuntaro Sato, Yuki Fukuda, Kazuki Kurasawa, Shogo Tsukaguchi, Yusuke Ogura, Masaru Enomoto, ○Shigefumi Kuwahara (Tohoku Univ.)

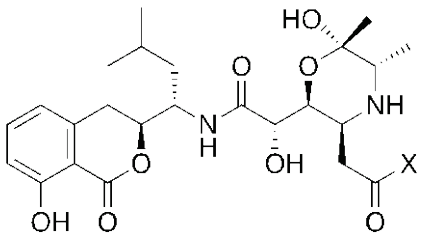
生物によって生み出される生物活性天然物は，しばしば人間の想像力を超越した斬新な化学構造を提示して有機合成化学の進歩を促すとともに，新規な医薬・農薬の開発のための糸口を提供してきた。本シンポジウムでは，特異な環状構造を有するいくつかの生物活性天然物の全合成研究について，著者らの研究成果を述べたい。

strophasterol 類（A~D）は，静岡大の河岸らによってサケツバタケ（食用キノコ）から単離されたステロイド系化合物であり，通常のステロイドの D 環が酸化開裂した後，側鎖との間で新たな五員環を形成した前例のない炭素骨格を有する。strophasterol A は小胞体ストレス誘導神経細胞死抑制活性及び抗 MRSA 活性に加えて，ヤマブシタケ，エノキタケの菌糸体に対して子実体形成誘導活性を示すことが明らかとなったが，単離標品のストックが底を付き，詳細な活性評価は実施されないままとなっている。著者らは，strophasterol 類の量的供給を目的として，比較的安価なステロイド原料である ergosterol から共通の中間体を経て strophasterol A と B を作り分ける合成戦略を立てた。本講演では，両者の全合成研究について，これまでの成果を述べたい。

bacilosarcin A~C を含む amicoumacin 類はジヒドロイソクマリン環を含むアミン部位と異常アミノ酸とがアミド結合で連結した一群の天然物であり，抗潰瘍活性，抗菌活性，細胞毒性，除草活性等，多様な生物活性を示す。著者らはこれまでに, bacilosarcin A, B を含む数種の amicoumacin 関連天然物の全合成を報告してきた。本講演では，bacilosarcin C の初の全合成と bacilosarcin B の改良合成について述べたい。




strophasterol A: 3'β
strophasterol B: 3'α




bacilosarcin B: X = $NH_2$
bacilosarcin C: X = OH

strophasterol, bacilosarcin, total synthesis

発表責任者：桑原重文（shigefumi.kuwahara.e1@tohoku.ac.jp）

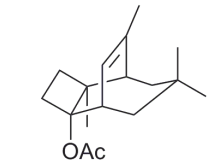
講演番号：2SY03-2
講演日時、会場：3 月 18 日 14:35～ C16 会場

# プロトイルダン型セスキテルペンの合成研究

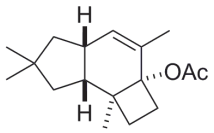
# Synthetic Study of Protoilludane Sesquiterpenes

○高須 清誠（京大院薬）
○Kiyosei Takasu (Kyoto Univ.)

プロトイルダン型セスキテルペンは 5-6-4 員環が縮環した炭素骨格をもっており、抗腫瘍活性やアレロパシー活性などの作用を示すことが知られている。我々は、触媒的[2+2]環化付加によるシクロブタンおよびシクロブテンの実践的合成法を開発しており、それらを基点にプロトイルダン類の合成に取り組んでいる。特に、6-4 員環の核間位にヒドロキシ基をもつ天然物は多く報告されているが、その合成は化合物の不安定性のため難しいとされている。

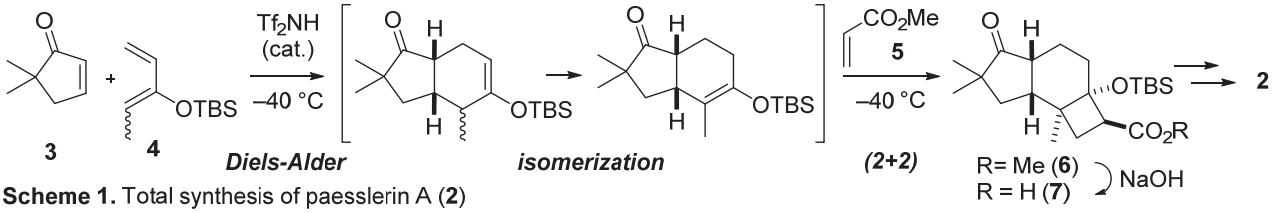


proposed structure of paesslerin A (**1**)



tentatively assigned paesslerin A (**2**)

以前我々は、海洋テルペノイド paesslerin A[1] の合成を行い、提出構造の誤りを明らかにした[2]。NMR データを詳細に解析した結果、真の構造は 7-protoilluden-6-ol のアセチル化体 **2** だと推定した。そこで合成により paesslerin A の真の構造を明らかにしようと考えた。Diels-Alder 反応、シリルエノールエーテルの異性化、[2+2]環化付加をひとつの触媒で進行させうるワンポット型連続反応を開発し、シクロペンテノン **3**、シロキシジエン **4**、アクリル酸メチル **(5)** からエステル **6** をワンポットで合成した。本反応は、２つの環化様式の分子間環化付加とアルケンの異性化を１種類の触媒が活性化することを特徴としており、極めて興味深く独自性の高いプロセスと位置付けられる。得られた **6** を **2** に導くには、シクロヘキサン環上の不活性 C–H 結合を何らかの方法で官能基化することが必要である。しかし、シクロブタン環を含む三環性構造の分子ひずみに起因した骨格転位などの副反応が主に進行し、目的の変換は困難を極めた。種々試行錯誤した結果、核間位ヒドロキシ基を足掛かりとするカルベンの挿入が有効であることを明らかにした。その後、数工程を経て **2** に変換し、そのスペクトルデータとの比較から paesslerin A の真の構造は **2** であることを明らかとした（Scheme 1）。現在、種々の酸化度をもつ天然物および誘導体の合成研究を展開している。



**Scheme 1.** Total synthesis of paesslerin A (**2**)

1) Brasco, M. F. R.; Seldes, A. M.; Parelmo, J. A. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1415.
2) Inanaga, K.; Takasu, K.; Ihara, M. *J. Am. Chem. Soc*., **2004**, *126*, 1352.

synthesis of natural products, cyclobutanes, biological activity

発表責任者：高須清誠（kay-t@pharm.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2SY03-3
講演日時、会場：3 月 18 日 15:10～ C16 会場

ミトコンドリア呼吸鎖複合体-I のキノン結合ポケットの特性
Characterization of the ubiquinone binding pocket of mitochondrial respiratory complex I
○三芳 秀人（京大農）
○Hideto Miyoshi (Kyoto Univ.)

プロトン輸送性 NADH-キノン酸化還元酵素（複合体-I）は呼吸鎖系の初発酵素で、細胞のエネルギー代謝を担う基幹酵素である。他の呼吸鎖複合体と同様に、複合体-I は殺虫・殺ダニ剤の重要な標的分子であることから、その基礎研究の大幅な進展が期待されている。しかし、複合体-I は複雑な膜タンパク質複合体であるために、他の複合体に比べて研究の進展が大幅に遅れている。2013 年と 2015 年に好熱細菌（*Thermus thermophilus*）および酵母（*Yarrowia lipolytica*）ミトコンドリアの酸化型複合体-I の X 線結晶構造がそれぞれ報告され［1，2]、複合体-I 研究は新たなステージに入った。阻害剤の作用機構を考える上で結晶構造が解かれた意義は極めて大きいが、残念ながらキノンも阻害剤も共結晶化されなかったため、これらの結合状態に関する情報は依然として限定的である。

結晶構造に基づくと、キノン結合ポケットは親水性ドメインと膜ドメインの境界領域に存在し、49 kDa、PSST および ND1 という 3 つのサブユニットによって構成されている。キノン結合ポケットは、入口幅約 7Å、奥行き約 30Åという細長い“洞窟様”の構造をとっていると報告されたが、このモデルには異論が出ている。例えば、「狭い洞窟様の構造を前提にして、キノン還元反応の早いターンオーバー（＞200 $sec^{-1}$）を説明できるのか？」などである。

我々はキノン結合ポケットの構造特性を知るために、ligand-directed tosyl chemistry ［3］によってポケットを構成する 49 kDa サブユニットの Asp160 を特異的にアジド化することに成功し、このアジド基と様々な合成分子プローブとのクリックケミストリーにおける反応性を精査した。その結果、キノン結合ポケットが細長い洞窟様の構造をとっているという前提に立ったのでは説明できない幾つかの実験結果を得た［4-7]。本講演では、結晶構造に基づいて提出されたキノン結合ポケットのモデルを否定的に検証することにより、阻害剤の作用機構を考察したい。

[1] Baradaran *et al*. (2013) *Nature* 494, 443-448. [2] Zickermann *et al*. (2015) *Science* 347, 44-49. [3] Tsukiji *et al*. (2009) *Nat. Chem. Biol*. 5, 341-343. [4] Masuya *et al.* (2014) *Biochemistry* 53, 2307-2317. [5] Masuya *et al.* (2014) *Biochemistry* 53, 7816-7823. [6] Murai *et al.* (2015) *Biochemistry* 54, 2739-2746. [7] Okuda *et al*. (2016) *Biochemistry* 55, 470-481.

respiratory complex I, ubiquinone, click chemistry

発表責任者：三芳秀人（miyoshi@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2SY03-4
講演日時、会場：3 月 18 日 15:45～ C16 会場

# 生体高分子と遷移金属錯体からなる超分子の機能化
# Functionalization of Supramolecules of Biopolymers with Transition Metal Complexes

○山口 浩靖（阪大院理）
○Hiroyasu Yamaguchi (Osaka Univ.)

生体高分子と合成金属錯体を複合化することにより、均一溶液中では不活性だった金属種をナノオーダーの空間を利用して活性化したり、反応生成物の立体構造を制御しようとする研究が近年盛んに行われている。抗体は人工系ホスト分子よりも大きく複雑な分子を特異的に認識し、強く結合することができる生体高分子である。我々はこれまでに抗体を活用して、センシング材料や特異的な反応場を設計してきた。また、抗体のみならず生体関連分子と合成高分子をハイブリッド化させることにより新しい触媒材料が創製できるようになった。本発表では機能化抗体の創製、抗体を利用した超分子錯体の合成、抗体と金属錯体のハイブリッド触媒、ならびに最近開発したヒドロゲル触媒について紹介する。

**モノクローナル抗体の超分子錯体形成を利用した不斉触媒システム**：抗体が遷移金属錯体と基質の分子両分子を取り込むように設計することにより、高度な反応制御及び立体選択的な触媒が構築できると考え、アキラルなロジウム錯体に対するモノクローナル抗体を作製した。一連の細胞工学操作により、ロジウム錯体を特異的に結合するモノクローナル抗体（IgM）が得られた。アルゴン雰囲気下、リン酸バッファー中、モノクローナル抗体 1G8 とロジウム錯体との複合体にアラニン前駆体である 2-アセトアミドアクリル酸を基質として添加した。この溶液に水素をバブリングし、37℃で 12 時間反応させた後、HPLC および GC を用いて反応生成物の鏡像体過剰率を決定した。ロジウム錯体では *N*-アセチルアラニン D-体／L-体のラセミ体が得られるのに対して、抗体 1G8 存在下では L-体のみが生成していることがわかった。抗体 1G8 はロジウム錯体と水溶液中において安定な錯体を形成し、基質特異性も有する厳密な不斉水素化触媒となることが明らかになった。

**生体関連分子と合成高分子をハイブリッド化させた触媒材料**：ヘム酵素 HRP から補因子を抜き出した apoHRP と補因子である鉄ポルフィリン(FePor)をそれぞれ導入したアクリルアミドゲルを合成した。これらのゲルが互いに接着することで触媒機能が発現する新しいシステムを構築することに成功した。apoHRP ゲルと FePor ゲルを 4 ºC で接触させたところ、ゲルが接着した。apoHRP ゲルと FePor ゲル存在下、HRP の基質（ここでは ABTS）の酸化反応を観察した。接着した 2 種ゲルの界面から反応生成物に由来する色が広がってくることが確認できた。apoHRP ゲルと FePor ゲルを接着させると ABTS の酸化反応が加速され、2 種ゲルを離すと反応が停止した。2 種類のゲルの接着－解離、つまり物理的な外力で酵素反応を制御できることがわかった。

Monoclonal Antibody, Supramolecular Complex, Hydrogel

発表責任者：山口浩靖（hiroyasu@chem.sci.osaka-u.ac.jp）

講演番号：2SY03-5
講演日時、会場：3 月 18 日 16:20～ C16 会場

他の人には見えないものを見て研究しよう！
Discovery consists of seeing what everybody has seen and thinking what nobody has thought
○大類 洋 (横浜薬大)
○Hiroshi Ohrui (Yokohama Univ. of Pharmacy)

和文演題は東北大学分子情報化学研究室でのモットーであり、英文はセントジェルジの言葉です。研究には Originality, Innovative, Breakthrough などが重要です。 貴方の研究は如何ですか？ どのようにすれば Originality, Innovative, Breakthrough に富む研究が出来るでしょうか？ 講演ではご参考になればと考え、私の研究を例として紹介させて頂きます。

私は理研で 15 年間「糖及びヌクレオシド関連化合物の合成研究」を行いました。研究方法は週３～４回図書室に行って新しい化合物や新しい反応に関する情報を誰よりも早く得て誰よりも早く目的化合物の合成を行うというものでした。この研究では自己満足は得られても研究成果が長い年月評価されるものでは有りませんでした。Originality, Innovative, Breakthrough に乏しかった為と思われます。

３９歳で東北大学農学部食糧化学科食品分析学教室に移り研究分野を変えてからは「有機化学の基本的な知識に基づいて、誰でも知っている情報の中に他の人には見えないものを見て、誰も考えたことが無いことを考え、問題解決の為の機能性分子を創製し解決不可能とされていた難題の解決を図る」ようにしました。ですから焦って情報を他の人より早く得る必要がなくなりました。創製には理研で行った有機合成が非常に役に立ちました。これらの研究は Originality, Innovative, Breakthrough に富むものと成り、その成果は定年 11 年後の現在も役に立っており高い評価も得ています。

1. 耐性 HIV を発現させず、これまでに無く非常に優れた抗 HIV 活性を持ち、低毒性で、生体中で安定であり長時間活性が持続する逆転写酵素阻害修飾ヌクレオシド **EFdA**(4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine)の創製、
2. ジアステレオマー法の問題点を解決した超高機能を持つ不斉識別法の創製、
3. ヒドロペルオキシド（活性酸素）の定量の為の発蛍光フォスフィン試薬の発明、

などを時間の許す限りお話しさせて頂きます。

参考文献

1. H. Ohrui; Proc. Jpn. Acad., Ser **87**, 53-65(2001)
2. H. Ohrui; Proc. Jpn. Acad., Ser. B **5**, 127-135(2007)
3. K. Akasaka, T. Suzuki, H. Ohrui, H. Meguro; Anal. Lett., **20**, 731-745(1987)

EFdA(an extremely excellent anti-HIV active modified nucleoside), chiral discrimination that has solved the diastereomer method, phosphine reagent for the determination of hydroperoxide

発表責任者：大類　洋（h.ohrui@hamayaku.ac.jp）

講演番号：2SY04-1
講演日時、会場：3 月 18 日 14:02～ C21 会場

Cellular delivery of B vitamins and lipoic acid by sodium/multivitamin transporter SMVT
○Pattama Wiriyasermkul (Columbia Univ.)

The B vitamins, a class of water-soluble vitamins, are essential in human physiology as they play important roles in various metabolic reactions. Although these vitamins coexist in the same foods, they possess distinct chemical structures and, thus, require different modes of entry across the plasma membrane for intestinal absorption. Pantothenic acid (vitamin $B_5$), a precursor of coenzyme A, and biotin (vitamin $B_7$), a coenzyme for fatty acid production, are B vitamins that are both transported by the human $Na^+$/multivitamin transporter (hSMVT). hSMVT is a member of the solute:sodium symporter (SSS) family. Members of the SSS family have been shown to couple the flux of $Na^+$ to the transport of their cognate substrate. Recently, we provided direct evidence for the transport of another hSMVT substrate, α-lipoic acid (LA). LA, a vitamin-like substance, is a potent antioxidant and anti-inflammatory agent used as food supplement and in therapeutic applications, e.g., in the treatment of diabetic neuropathy and Alzheimer's Disease. The *R*-(+) enantiomer of LA (*R*-LA) is produced *de novo* in small amounts in mitochondria or it is found in food stuff in protein-conjugated form. Commercial available LA is the mixture of *R*-LA and *S*-LA. We found that SMVT selectively transports *R*-LA, the biological active form, but not *S*-LA. To understand the mechanism of transport we determined kinetics of substrate binding and transport by purified hSMVT. Moreover, we built a new structural model of hSMVT and predicted the substrate binding sites for its three organic substrates. Our study will provide insight into the molecular events in hSMVT that regulate the delivery of B vitamins and *R*-LA in therapeutic applications.

nutrient, absorption, antioxidant

発表責任者：Wiriyasermkul, Pattama（pw2399@cumc.columbia.edu）

講演番号：2SY04-2
講演日時、会場：3 月 18 日 14:27～ C21 会場

# コレステロールおよび胆汁酸の腸管吸収機構と食品成分によるその制御

# The intestinal absorption mechanisms of cholesterol and bile acid and regulation by food constituents

○小林 彰子（東大院農）
○Shoko KOBAYASHI (UTokyo)

コレステロールは生体にとって必要不可欠な成分であるが、高コレステロール血症は動脈硬化や心筋梗塞などのリスクを高める。高コレステロール血症治療の第一選択薬は肝臓でのコレステロール合成を阻害するスタチン系薬物だが、同じ阻害機構の薬物のみでは副作用など、治療の限界があるため、新たな治療薬としてエゼチミブが開発された。エゼチミブはメカニズムが不明なまま臨床実験が開始されたが、その後ターゲット因子としてコレステロールトランスポーター（Niemann-Pick C1 Like 1, NPC1L1）が発見された。血中コレステロール量は、肝臓における *de novo* の合成と食事からの吸収量で調節されている。ヒトでは血中の 70～80%が肝臓での合成、20～30%が食事由来と見積もられており、肝臓における合成が主である。小腸において NPC1L1 により吸収されるコレステロールは、食事中のコレステロールと食後腸管へと排出される胆汁中のコレステロールの総和であるため、肝臓から腸管へ排泄されたコレステロールの吸収を抑制することは体内コレステロール量の減少に繋がる。

さらに、胆汁中に含まれる胆汁酸の 95%は、小腸下部に発現する胆汁酸トランスポーター(apical sodium-dependent bile acid transporter , ASBT)から再吸収され、肝臓へと運ばれ、再び腸管へ分泌される（腸肝循環）。肝臓で生合成される胆汁酸はコレステロールを原料とするため、腸管からの胆汁酸の再吸収抑制はコレステロールからの胆汁酸への変換を促進し、血中コレステロールの低下をもたらす。

NPC1L1 の阻害薬としてはエゼチミブが、胆汁酸を吸着し血中コレステロールを低下させる薬剤としてはコレスチラミンがあるが、NPC1L1 および ASBT に直接作用し、吸収を調節する食品成分についてはほとんど報告がなかった。そこで我々は、腸管吸収のモデルとして汎用性の高いヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞を用いてポリフェノールをスクリーニングし、NPC1L1 および ASBT の阻害成分として、それぞれ、ケルセチンおよびルテオリン、およびテアフラビン類を見出した。

本シンポジウムでは、NPC1L1 および ASBT のそれぞれの腸管吸収トランスポーターとしての機能およびその役割について講じ、我々の見出したケルセチンおよびルテオリンの NPC1L1 阻害機構および転写因子を介した発現抑制機構について、またテアフラビン類の ASBT 阻害機構について紹介する。

Niemann-Pick C1 Like 1, apical sodium-dependent bile acid transporter, transporter

発表責任者：小林彰子（ashoko@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2SY04-3
講演日時、会場：3 月 18 日 14:57～ C21 会場

# フィトケミカルによるグルコーストランスポーターの制御・調節
# Regulation of glucose transporter by phytochemicals

○薩 秀夫（前工大工）
○Hideo Satsu (Maebashi Inst. Tech.)

糖質は消化管にて消化酵素によって分解されうる炭水化物とされ、生体内において主要なエネルギー源として利用される。例えばデンプンなどの多糖類は、α-アミラーゼによって少糖類・二糖類にまで分解され、さらに腸管上皮細胞に発現するα-グルコシダーゼによって単糖にまで分解される。最終消化された単糖は、腸管上皮細胞の管腔側に発現するグルコーストランスポーターによって吸収される。グルコースとガラクトースは $Na^+$/グルコース共輸送担体 1(SGLT1)によって、フルクトースは促通拡散型グルコース輸送担体 5（GLUT5）によってそれぞれ細胞内に取り込まれることが知られている。上皮細胞内に取り込まれた単糖は、基底膜側に発現する GLUT2 によってさらに血管（門脈）側へと輸送される。

一方、現在社会的問題となっている生活習慣病の中でも、糖尿病は世界的にもその患者数の増加が懸念されている疾患である。2015 年に発表された国際糖尿病連合（IDF）のデータでは、全世界で糖尿病患者は約 4 億 1500 万人とされ、このままのペースで増加が続くと 2040 年には約 6 億 4200 万人まで増加することが予想されている。この増加の一因として、高果糖コーンシロップ（High-fructose corn syrup(HFCS)、日本では「果糖ブドウ糖液糖」などと表示される）を含む清涼飲料水などの摂取量の増加が注目されている。HFCS は砂糖よりも安価で甘みが強いことから、清涼飲料水・菓子類など甘みの強い加工食品の材料として近年急速に使用が広がっている。しかしながら、HFCS 摂取量の増加が肥満や糖尿病などの原因あるいは悪化の一因となっている可能性が示唆されており、近年子供の肥満が増加している一因としても懸念されている。さらに実験動物などを用いた研究では、HFCS の主成分であるフルクトースの過剰摂取によって脂肪肝や高血圧などが誘導されることも報告されている。

このような背景のもと当研究グループでは、HFCS の主成分であるグルコースおよびフルクトースの腸管吸収を抑制することで糖質過剰摂取に起因する糖尿病はじめ生活習慣病を予防することを目的とし、SGLT1/GLUT5 を阻害するフィトケミカルの探索・解析を進めた。ヒト SGLT1 およびヒト GLUT5 の安定高発現株を構築しこれを用いてスクリーニングをおこなった結果、いくつかのフィトケミカルが SGLT1 活性あるいは GLUT5 活性を阻害することを見出した。本シンポジウムでは、見出されたフィトケミカルの阻害特性や機構、in vivo での作用についても報告する。

transporter, phytochemical, intestinal epithelial cell

発表責任者：薩　秀夫（satsu@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：2SY04-4
講演日時、会場：3 月 18 日 15:27～ C21 会場

# 消化管リン輸送機構の役割

# The role of gastro intestinal phosphate transport system in health and disease

○瀬川 博子、宮本 賢一（徳島大院　医歯薬学研究部　分子栄養学分野）
○Hiroko Segawa, Ken-ichi Miyamoto (Tokushima Univ.)

リンは骨の重要な構成要素であるだけでなく、細胞内で ATP などの高エネルギーリン酸化合物の構成成分としてエネルギー代謝の維持に必須の役割を演じている。また細胞膜のリン脂質を構成し、細胞膜機能の維持のうえでも重要な役割を果たしている。多くの生理機能を担うリンの生体内バランスは厳密にコントロールされており、この恒常性の破綻は生命の危険をも招く。血中リン濃度は腸管からの吸収、骨形成、骨吸収および、腎からの排泄と再吸収が様々な因子に応答し、そのバランスが保たれている。食事に含まれるリン含量、活性型ビタミン D、またリン利尿因子である副甲状腺ホルモン(Parathyroid hormone; PTH)や Fibroblast growth factor (FGF) 23 が中心的なリン吸収/再吸収調節因子である。

リンは、肉や魚など動物性たんぱく質源とした食品に多く含まれる他、乳製品、種子類に含まれる。さらに、食品添加物として、無機モノリン酸塩や無機ポリリン酸塩の形態で加工食品に含まれる。このように、食品由来のリンは有機リンおよび無機リン酸塩の形で存在する。様々な形態で含まれるリンであるが、腸管での吸収は無機モノリン酸の形態で吸収されると考えられている。腸管リン吸収機構は、ナトリウム($Na^+$)依存性リントランスポーターを介する経細胞輸送と細胞間隙を介する受動輸送が想定されている。 腸管上皮細胞刷子縁膜側（管腔側）における $Na^+$依存性リントランスポーターは、SLC34A2 や SLC20A1 などが同定されているが、細胞間隙を介する分子機序は明らかとなっていない。

透析患者や慢性腎臓病（Chronic Kidney Disease：CKD）における高リン血症は、骨病変が起こるのみならず，血管を含んだ全身の石灰化を介して生命予後に影響することが明らかとなり，近年，全身性疾患としての CKD に伴う骨ミネラル代謝異常が提唱されている。CKD 患者では、食事からの Pi の制限や経口のリン吸着剤を使用することで、リン負荷を是正することが現在重要であると考えられている。しかしながら、食事制限の難しさ、リン吸着剤による消化器への副作用などにより、より効果的な対処療法が求められている。よって、腸管リン吸収機構の解明は、重要であることがわかる。

本シンポジウムでは、現在報告されている基礎データをもとに現時点で明らかにされている腸管リン吸収のメカニズムについて概説する。

phosphate, transporter, intestine

発表責任者：瀬川博子（segawa@tokushima-u.ac.jp）

講演番号：2SY04-5
講演日時、会場：3 月 18 日 15:57～ C21 会場

# 栄養食品成分の吸収・排出を担う膜輸送体の網羅的定量プロテオミクスによる変動解析

# Comprehensive proteomics reveals alteration of membrane transport proteins responsible for absorption and excretion of nutrients and food ingredients.

○永森 收志（阪大院医）
○Shushi Nagamori (Osaka Unv. Grad. Schl. Med.)

栄養食品成分の吸収・排出を担う生体内の様々な輸送体（トランスポーターやポンプ）は、基質である栄養食品成分に対応して非常に多様性に富んでいる。輸送体の基質認識機構は、比較的厳密なものから幅広い選択性を持つものまで存在するが、基本的に類似した性質を持つ栄養食品成分は同一のトランスポーターにより輸送される。例えば、アミノ酸トランスポーターEAAC1(SLC1A1)は、グルタミン酸を含む酸性アミノ酸を輸送する。また、トランスポーター間では基質選択性の重複も見られ、ヒトでは約 60 分子が報告されているアミノ酸トランスポーターのうち、グルタミン酸を輸送するトランスポーターは EAAC1(SLC1A1)以外にも 10 種類以上存在する。このような同一の基質を輸送するトランスポーターは、同一の膜ドメインに共発現する場合があり、そこでは異なった輸送形式を持って協調的に働くことで、発現する細胞や組織の特性を維持する役割を果たしていると考えられる。我々は、同一の基質を輸送する異なるトランスポーター分子が、この基質選択性の重複を利用して機能共役していることを見いだした。これらのトランスポーターは生体膜上で互いに近接しており、複数の異なる輸送体を含む膜輸送体複合体の形成も観察された。通常、トランスポーターなどの輸送体の機能解析は単独分子の機能を明らかにすることを目的としており、他の分子の影響については評価の対象としていない。しかしながら、実際は多くの輸送体が生体内で相互に機能共役しながら働き、その結果として特定の輸送機能が実現していることが示唆された。したがって、栄養食品成分の吸収・排出の分子機序を明らかにするためには、その輸送体群全体を膜輸送の機能単位として捉え、研究対象とする必要がある。我々は、膜タンパク質の網羅的定量プロテオミクスを用いることで、食品や栄養素、添加物、薬物の投与に伴い、消化管や腎尿細管、骨格筋、肝臓、脂肪組織等に発現する輸送体群の発現プロファイル変動の全体像を把握することに成功した。その実例として、アミノ酸、糖、人工甘味料による小腸上皮細胞における膜輸送体の網羅的発現変動の結果を示し、外的内的要因に対する膜輸送機能の変動を生体応答の一貫として把握することの重要性について議論をしたい。

transporter, proteome, epithelial cell

発表責任者：永森收志（nagamori@pharma1.med.osaka-u.ac.jp）

講演番号：2SY04-6
講演日時、会場：3 月 18 日 16:27～ C21 会場

# タイトジャンクション構成タンパク質クローディンが規定する生体微小環境恒常性と消化管機能
# Tight junction protein claudin as a regulator of microenvironments and functions in digestive system

○田村 淳[1,2]、田中 啓雄[2]、高橋 信之[3]、月田 早智子[1,2]([1]阪大生命、[2]阪大医学、[3]東京農大)
○Atsushi Tamura[1,2], Hiroo Tanaka[2], Nobuyuki Takahashi[3], Sachiko Tsukita[1,2] ([1]Osaka Univ. FBS, [2]Osaka Univ. Med., [3]Tokyo Univ. of Agr.)

小腸の表面は、吸収上皮細胞どうしの接着により生じた上皮細胞シートにより覆われる。その中で最も数の多い吸収上皮細胞のアピカル膜には、ナトリウム(Na)イオン依存性のトランスポーターがあり、食事で摂取した栄養素の多くが吸収される。この間、腸管内 Na イオンは、栄養とともに枯渇の方向に向かうはずである。必要な Na イオンは、一般に、食事や消化管液により供給されると考えられてきたが、それだけでは説明できない。私共では、細胞間接着装置タイトジャンクション（TJ）の構成タンパク質であるクローディン（Cldn）の Cldn-2 や Cldn-15 が、Na イオンのための透過路を上皮細胞間に形成することで、血管側から腸管内への Na イオンの供給が可能となり、腸管内のイオン環境の恒常性が保たれることを、Cldn-2 や Cldn-15 のノックアウト（KO）マウスの解析から示した。

２つの主要なチャネル型の Cldn-2,-15 のダブル KO マウスでは、細胞間の Na イオンの透過性はさらに低下し、腸管内の Na イオン濃度は腸管全域で極度に低下した状態となり、Na イオン依存的なブドウ糖や多くのアミノ酸の吸収が、致死的レベルまで低下する。小腸に存在するこうした Na イオン依存的トランスポーターによる栄養吸収ばかりではなく、回腸末端部における Na イオン依存的トランスポーターによる胆汁の回収も低下する。いわゆる、腸肝循環も大きく抑制されることが分かった。この結果、Na イオン非依存的に小腸で吸収される脂質についても、その消化・吸収が低下した。３大栄養素すべての吸収が障害され、Cldn-2,-15 のダブル KO マウスは、離乳前後で 100%致死となる。

これまで、皮膚や血液脳関門における強固なバリアとしての機能の重要性が注目されてきた TJ の機能は、細胞間チャネルを形成して、小腸などにおいては、その適切な透過性により、生体微小環境の恒常性と生体システムの重要な機能の発揮に欠かせないことを明瞭に示した。

Cldn は、小腸に限らず、すべての上皮性臓器の組織微小環境の特性制御に関わる。肝臓では、Cldn-1,-2,-3 が多く発現する Cldn であるが、肝小葉内におけるそれらの偏った発現が、毛細胆管内での胆汁流の整流性をつくるとともに、胆汁成分を適切に保つことで、胆石形成を防いでいることが、私どもの Cldn KO マウスの解析から示唆されている。

本シンポジウムでは、消化器系生体機能における TJ 制御の重要性ついて、特に、TJ の選択的な透過性という点に焦点を当てた議論を進める。

tight junction, claudin, microenvironment and biological function

講演番号：2SY05-1
講演日時、会場：3 月 18 日 14:06～ C22 会場

# アミノ酸の代謝制御と生理機能に基づく酵母の高機能開発

Breeding of yeast based on metabolic regulation and physiological function of amino acids

○高木 博史（奈良先端大バイオ）
○Hiroshi Takagi (Nara Inst. Sci. Tech.)

酵母（主に *Saccharomyces cerevisiae*）はパン、酒類などの発酵・醸造食品、バイオエタノール、酵素、医薬品などの製造に使用され、8 兆円超と想定される巨大市場を形成している。育種としては、自然分離、突然変異、交雑・融合などの古典的技術によって、発酵プロセスの高度化や効率化に向けた酵母の開発が続けられている。一方、ゲノム情報を活用し、酵母の有用機能（エタノール、炭酸ガス、味・風味成分、アミノ酸、酵素などの生産）を向上させる研究も進んでいる。特に、次世代型シーケンサーを用いた様々なオミクス解析によって、迅速かつ膨大なデータを得ることが可能になり、育種への応用が期待されている。また最近では、CRISPR/Cas9 システムが酵母においても機能することが判明し、高度なゲノム編集が可能になってきた。本講演では、酵母における育種の現状を整理した上で、我々が進めてきた酵母の高機能開発に関する研究を紹介し、今後の育種について議論したい。

酵母は種々の発酵プロセスにおいて、高濃度エタノール、高温、冷凍、乾燥、高浸透圧、酸化、低 pH、発酵阻害物質、低栄養など多様なストレスに曝され、有用機能が制限されるため、酵母に高度なストレス耐性能を付与することが重要である。我々は、実験室酵母に見出した「アミノ酸の新規な代謝制御機構と生理機能」を解析し、得られた知見を産業酵母の育種に応用することを目指している。これまでに、セルフクローニング法（遺伝子組換え技術？）によって、プロリンやアルギニンを高生産するパン酵母を作製し、製パン過程における様々なストレス条件下で（冷凍、乾燥、高ショ糖など）、野生型株に比べて良好な発酵特性や製パン性を示すことを報告している。しかし、遺伝子組換え技術に対する社会的受容性が低いため、このような酵母の実用化は未だに困難な状況にある。そこで、遺伝子組換え技術を使わずに、実用化可能な産業酵母を開発することを目的として、アミノ酸アナログ耐性を指標に、特定のアミノ酸を高生産する菌株を古典的技術（突然変異導入）により効率的に取得する方法を考案し、種々の産業酵母の高機能開発（発酵生産性・香味性の向上）に成功している。例えば、沖縄の伝統的蒸留酒「泡盛」は香りと味に特徴があり、それらの生成には酵母が関与するが、泡盛酵母の育種は全く行われていなかった。そこで、パン・清酒の主要香気成分として知られ、ロイシンの合成量に依存する酢酸イソアミルとその前駆体であるイソアミルアルコールを高生産する泡盛酵母をロイシン含量が顕著に増加した変異株の中から分離した（同株で製造した泡盛が昨年商品化）。このように、酵母の細胞内アミノ酸含量を制御することで、高度なストレス耐性の付与による発酵食品・バイオエタノールの生産性改善、味・風味の差別化が可能な酒類の製造などが期待できる。

Yeast, Amino acid, Breeding

発表責任者：高木博史（hiro@bs.naist.jp）

講演番号：2SY05-2
講演日時、会場：3 月 18 日 14:34～ C22 会場

# イオンビーム育種による新規発酵プロセスのための高機能糸状菌の開発

# Development of high-performance fungi for novel fermentation processes by ion beam breeding

○星野 一宏[1]、高野 真希[1]、畑下 昌範[2] ([1]富大理工、[2]若狭エネ研)
○Kazuhiro Hoshino[1], Maki Takano[1], Masanori Hatashita[2] ([1]Univ.Toyama, [2]WERC)

突然変異を利用した品種改良では、これまで X 線やγ線などの放射線が使われてきましたが、近年、イオンビームが高い変異誘導効果をもつことが示され、野菜や花卉の品種改良への応用が期待されています。イオンビームは、X 線やγ線と比べて、高い線エネルギー付与(LET)を有し 従来の放射線変異法と比較して突然変異率が高く、突然変異のスペクトルが広く、さらに付随する変異が少ないという特徴を有します。しかし、この変異誘導メカニズムはまだ完全に明らかにされておらず、大半の変異は、DNA の二本鎖切断や欠失により生じていることが示され、今後の研究の進展が期待されています。また、植物以外の変異誘導の応用例として、醸造酵母酵母の香りの改善、微細藻類の脂質蓄積向上、担子菌による抗がん剤の生産などへの応用が報告されていますが、その応用例が少ないのが実状です。我々は、数年前より糸状菌を活用したバイオマスからの有用物質発酵生産の実用化を検討してきました。その開発の一環として、遺伝子組換え技術を活用せず、カルタヘナ法に抵触しない新規な育種法としてイオンビーム育種に注目してきました。特に、イオンビーム変異法は、広範囲な変異誘導が起こせる可能性があることから細胞内の代謝反応を大幅に改変できると期待できます。本講演では、(公財)若狭湾エネルギー研究センター(WERC)の多目的加速器システム(W-MAST)を活用し、プロトン($^{1}H^{+1}$)およびカーボンイオンビーム($^{12}C^{6+}$)によるエタノール発酵糸状菌の Mucor による Xylose 発酵能の改善、 乳酸発酵糸状菌 Rhizopus による Xylose 発酵向上株の育種、および 45℃エタノール発酵糸状菌の開発に関する研究開発を紹介します。

現在、イオンビームによる品種改良は、日本原子力研究開発機構のイオン照射研究施設(TIARA)、理化学研究所の加速器研究施設(RARF)、放射線医学総合研究所の重粒子がん治療装置(HIMAC)および若狭湾エネルギー研究センター（WERC）で利用が可能であり、多くの研究者に活用して頂き、イオンビーム育種の有用性を見出していただけることを期待します。

ion bream breeding, fungi, fermeation

発表責任者：星野一宏（khoshino@eng.u-toyama.ac.jp）

講演番号：2SY05-3
講演日時、会場：3 月 18 日 15:02～ C22 会場

# 実験室進化・適応育種に基づく耐熱性機構の解析と高温発酵系の開発

# Analyses of Thermotolerance Mechanism and Development of High-temperature Fermentation based on Experimental Adaptation

○松下 一信[1,2] ([1]山口大農、[2]山口大中高温微セ)
○Kazunobu Matsushita[1,2] ([1]Yamaguchi Univ., [2]RCTMR)

■ 実験室進化と適応育種：「実験室進化」の研究は，これまで主に大腸菌を用いて，耐熱性の獲得などのゲノム進化の研究として進められてきた。最近，ゲノム解析技術の発展と相まって，「実験室進化」に基づく，種々のストレス耐性（耐熱性，抗生物質耐性，溶媒耐性等）獲得を目指した「適応育種」研究が行われている。しかも，その流れはモデル微生物から発酵微生物へと拡大され，実験室進化・適応育種手法のバイオテクノロジーでの利用へと広がっている[1)]。

■ 適応育種「耐熱化」発酵微生物の開発：私達は，この適応育種の手法を中心にして「耐熱化」微生物を育種する研究を 10 年ほど前からチームを組んで始めた[1)]。「耐熱化」発酵微生物を取得し利用できれば，発酵における冷却エネルギー消費を抑制できるだけでなく，これまでその温度依存的な不安定要因のために多用されている低温培養や発酵生産の不良を克服することができる。また，耐熱化は菌株の強靭化をもたらすと期待され，ロバスト化菌株の普及による微生物発酵の安定化・高効率化・低廉化を通じて，グリーンバイオ・ホワイトバイオの促進に大きく貢献できると期待される。

■ 比較ゲノム解析に基づく耐熱性機構の解析：現在，酢酸菌・酵母・*Zymomonas* 菌・*Corynebacterium* 菌・大腸菌を用いて研究を進めているが，適応育種によって，実用可能な「耐熱化」発酵微生物を創出するとともに，耐熱化育種株と親株との比較ゲノム解析を基に「耐熱化」寄与遺伝子を特定し，それらの遺伝子工学的な検証・評価によって，普遍的な「耐熱化機構」を解明することも目指している。比較ゲノム解析では，育種された菌株によって様々に異なる遺伝子に変異が認められるが，細胞表層・膜輸送・転写翻訳系遺伝子群に多くの変異が認められる。一方で，耐熱化育種株に共通して，ROS 生成の低下と高温下での ROS 抑制因子の発現増加が確認されている。

■ 酢酸菌の耐熱化育種と高温発酵系の開発：今回，演者らが中心に進めているいくつかの酢酸菌の耐熱化育種[2, 3)]とその比較ゲノム解析[1, 3)]，それらの生理学解析を含めた耐熱性機構の解析について紹介するとともに，得られた高温適応耐熱化株を利用した高温発酵系の開発[1)]について紹介する。

1) Matsushita K et al., Genomic analyses of thermotolerant microorganisms used for high-temperature fermentations. ***Biosci Biotechnol Biochem*, 80**, 655-668 (2016)
2) Hattori H et al., High-temperature sorbose fermentation with thermotolerant *Gluconobacter frateurii* CHM43 and its mutant strain adapted to higher temperature. ***Appl Microbiol Biotechnol,* 95**, 1531-1540 (2012)
3) Matsutani M et al., Adaptive mutation of *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 enhances acetic acid fermentation ability at high temperature. ***J Biotechnol,* 165**,109-119 (2013)

本研究は，現在 JST-ALCA の支援のもとに進められている。

Experimental adaptation, Thermotolerance, High-temperature fermentation

発表責任者：松下一信（kazunobu@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：2SY05-4
講演日時、会場：3 月 18 日 15:30～ C22 会場

# 有用微生物酵素の探索と物質生産プロセスへの展開
# Development of useful microbial enzymes and its application to bio-production process

○木野 邦器（早大・先進理工）
○Kuniki KINO (Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

微生物の多様性を担う固有の代謝や酵素の機能を利用した物質生産プロセスは、これまでに数多く開発されており、医療、食糧、健康、ものづくりなど広い分野に展開され、私たちの生活の豊かさに貢献している。生産される物質は生体成分にとどまらず、低分子から高分子の非生体成分や非天然型の化合物、さらには専ら化学合成に依存している機能性化成品など多岐にわたっており、その製造プロセスも、微生物機能の多様性を反映して多彩である。

我々人類は、現在、環境やエネルギーおよび食糧などの点において地球規模の深刻な問題を抱えている。さらに、健康長寿社会や持続的社会の実現に向けて具体的かつ実効性のある打開策を見出すことが喫緊の課題となっている。一方、生命科学における新たな発見や知識の集積に加えて、ゲノム解析や編集、メタボローム解析など技術分野における著しい進展、さらには情報工学など異分野との融合による目覚ましい技術革新などを背景として、バイオテクノロジーによる新たな可能性や価値の創出に大きな期待が寄せられている。

微生物機能を高度活用する物質生産プロセスの開発においては、目的の機能（代謝経路、産生化合物、酵素特性や活性など）を有する微生物の探索が重要な鍵を握る。微生物の作り出す化合物の構造多様性は魅力的であるが、その探索には多大な時間と労力を必要とする。酵素探索も同様であるが、最近では、ゲノム情報を活用したユニークな戦略や、新旧の技術を巧みに組み合わせて目的遺伝子や酵素の探索、活性の発現、機能の解析や改変などを検討する例が多くなってきた。地球上に生息する微生物のほとんどは未知であり、その領域を切り拓くことは新たな可能性の創出につながるものと期待できる。微生物固有の代謝機能に加え、微生物間あるいは微生物と動植物との相互作用に基づいて起きる様々な生物反応に関しても明らかになっていない点が多く、そのシステムを理解・応用することは有益であり、新たな発想と工夫を加えることでさらに飛躍的な展開が可能になると考えている。

本講演では、こうした背景を踏まえ、我々が検討している有用物質生産に向けた酵素探索とプロセス開発の取り組みを紹介し、新たな可能性を模索したい。

microbial enzyme, screening, bioprocess

発表責任者：木野　邦器（kkino@waseda.jp）

講演番号：2SY05-5
講演日時、会場：3 月 18 日 15:58～ C22 会場

# 微生物の分離培養の限界とその克服をめざして

# Exploring strategies for cultivations of uncultivated organisms

○鎌形 洋一[1,2] ([1] 産総研、[2] 北大農)
○Yoichi KAMAGATA[1,2] ([1]National Inst Adv Industrial Sci & Technol (AIST), [2]Hokkaido Univ)

実験室で「純粋に分離培養された微生物」が近代微生物学の革命的発展をもたらした。その源流は19世紀後半「病原性微生物を純粋に分離培養する」ことによって当時混沌としていた感染症の真の原因を明らかにするための数多くの微生物学者の奮闘に遡ることができる。微生物を「純粋培養する」という今日当たり前に行われている手法は、膨大な試行錯誤と偶然の産物である。一方、微生物の多くが固体培地上でコロニーを形成しない、あるいは液体培地で増殖しないといった現象は古くから経験的に知られていた。過去20年にわたる分子遺伝学的解析、さらには近年の大規模メタゲノム解析がそのことを鮮明に浮き彫りにした。今や微生物の多くは培養できない（あるいはまだ培養されたことがない）ことが常識となった。大規模メタゲノム解析によって培養を経なくても遺伝子情報やゲノム情報が得られることから、微生物を分離培養するために多くの時間を費やすことが非効率性だと考えられるようになった。しかし、今も純粋培養を基本にした方法を凌駕できる技術は生まれていない。大規模メタゲノム解析によって得られる遺伝子配列の機能推定は純粋に培養された微生物のゲノム情報と生化学情報に完全に依拠しているからである。

一方、微生物の分離培養の持つ「限界」を克服しなければ、日々蓄積されるゲノム情報・メタゲノム情報との乖離が著しくなるばかりである。旧来の培養手法のどこに限界があるのか、そしてそれを打破して新たな手法の確立ができるのか、という本質的な問いに答えていかなければ再び分離培養を基軸とする微生物バイオテクノロジーへの回帰はない。考慮すべき主要課題は以下のとおりである。1) 既存の固体培養法や液体培養方法に決定的な限界がある。 2) 標的微生物の棲息する特定環境を疑似するには現状の方法に限界がある。3) 異種微生物間さらには微生物–植物/動物の相互作用やネットワークを考慮した培養法が確立されていない。4) high throughputな培養プラットフォームの開発が進んでいない。本講演ではこうした現実とその解決方法について俯瞰的に概説したい。

演者らはこれらの課題のうち、特に固体培養法に潜む重大な欠陥の解明ならびに異種微生物間相互作用を利用した微生物の分離培養方法の開発などに注力してきた。寒天を用いた固体培養法は多くの経験的知見が蓄積したもので一見成熟したかに見えるが、我々は培地調製過程で非生物的な活性酸素種の発生を初めて定量的に明らかにした。こうしたラジカルの生成は環境中から直接微生物を培養する際、致命的な影響を与えると同時に、大きな培養バイアスを生む可能性があることも明らかにした。こうした研究成果も併せて紹介したい。文献) *Appl. Environ. Microbiol.,* **80:** 7659-7666 (2014)

uncultured organisms, agar medium, microbial network

講演番号：2SY05-6
講演日時、会場：3 月 18 日 16:26～ C22 会場

# 大規模天然物ライブラリーによるスクリーニングと新しい微生物二次代謝産物生産法の開発

# Screening with large-scale natural product library and the development of next-generation production technology of microbial secondary metabolites

○新家 一男[1]、池田 治生[2] ([1]産総研、[2]北里大)
○Kazuo Shin-ya[1], Haruo Ikeda[2] ([1]AIST, [2]Kitasato University)

天然物は人智の及ばない構造を有しており、また豊富な生物活性を発揮することから、長い間創薬スクリーニングのライブラリーとして応用されて来た。しかしながら、50 年以上におよぶ化合物探索の結果、近年新規化合物の発見が困難になってきている。また、新しい概念のアッセイ法が天然物ライブラリーに適合していないことが多くあり、最先端の分子標的に対するスクリーニングが困難になってきているのも、天然物スクリーニングの衰退の一因となっていると考えられる。

我々は、新たな天然物スクリーニングの可能性を見出すことを目的に、我が国の製薬系企業の天然物ライブラリーを集結した大規模な天然物ライブラリーを構築し、最先端の表現系スクリーニングを含めた種々の創薬スクリーニングを展開した。その結果、細胞形態を指標にした表現系スクリーニングや、細胞レベルでのスクリーニング系において、強力な生物活性を示しこれまでに無い新奇な骨格を有する天然化合物を多数見出すことに成功したので、本シンポジウムでは幾つかの例を紹介する。

大規模天然物ライブラリーを用いたスクリーニングにおいて、蛍光ラベルを用いたアッセイ系など、天然物抽出ライブラリーが適用困難なケースが幾つか見られた。そこで、天然物抽出ライブラリーに加えて、単離天然物ライブラリーおよび HPLC 分画ライブラリーの拡充を進めたが、多大な労力に反して有用な成果は得られなかった。そこで、従来の単純な発酵法による天然化合物生産法に代わる、次世代型の天然化合物生産法の開発を進めた。新奇化合物の発見率が低下しているのに対し、近年のゲノムシークエンス技術の進歩により、微生物特に放線菌ゲノム中には従来の発酵法で生産出きる化合物は、全生合成遺伝子中の 1/3 から 1/10 に過ぎないことが明らかになってきた。したがって、これらの未利用生合成遺伝子を発現させることにより、多数の新奇化合物を得ることが期待されている。我々は、天然化合物の合成化合物に対して最も大きな優位性である、マクロライド系化合物あるいは環状ペプチド系過度などの分子量の大きな化合物に着目し、生合成遺伝子を用いた異種発現系による天然化合物生産技術の開発を行った。その結果、200 kbp を超えるゲノムライブラリーを調製する技術を開発し、このような巨大な生合成遺伝子クラスターをホストに導入する技術、またサイレントな遺伝子を発現誘導するプロモーター等の開発に成功した。本シンポジウムでは、これらの技術を応用した、異種発現システムによる天然化合物生産法について紹介する。

Natural products, Large-scale drug screening, Biosynthesis

講演番号：3SY01-1
講演日時、会場：3 月 19 日 09:00～ C21 会場

# ストリゴラクトンージベレリン間クロストークとその応用

# Strigolactone-gibberellin crosstalk and its application

中村 英光、○浅見 忠男（東大院農生科）
Hidemitsu Nakamura, ○Tadao Asami (Univ. Tokyo)

SL が示す多様な生理活性の中で、枝分かれ（分げつ）の抑制と根寄生雑草種子の発芽促進活性に着目し、それら活性と GA との関係について追究していく過程で、イネの GA 処理にともないイネ中 SL 量の著しい減少、そして野性型を含む SL 欠損イネや SL 非感受性イネの分げつ減少が起きることを見出した。この結果は GA シグナルの利用により、イネの形態制御だけでなく根寄生雑草被害を低減できる可能性を示している。また上記 SL と GA 間の生理作用レベルでのクロストークの仕組みについても追究を行い、イネ GA 情報伝達因子 DELLA タンパク質 SLR1 と SL 受容体 D14 が相互作用する可能性を見出した。さらに三次元構造の解析により SL の加水分解により生じる D 環部分が切り出された D-OH が D14 との複合体を形成することを明らかにし、D14 による SL 分解が活性発現に重要であること、その際に生じた D-OH が重要な役割を果たしていることを提示してきた。この結論は他グループによる D-OH-D14-D3 複合体結晶構造の報告により裏付けられている。

これら知見を総合し、天然型 SL 類より高活性かつ安価に一段階合成が可能な SL アゴニスト 4BD を開発したが、4BD はイネ分げつ抑制特異的であり、根寄生雑草 *Striga* 種子発芽促進活性は著しく弱かった。そこでさらに多種多様な化合物の合成と活性評価を行い、D 環構造を含み *Striga* 種子発芽活性が高い化合物を見出した。これら化合物は宿主が存在しない状態で土壌中の種子発芽を誘導するために、根寄生雑草種子を寄生させずに枯死できる（自殺発芽誘導）。また化合物開発の際に、根寄生植物 SL 受容体への種々の化合物の作用を簡便に評価する系として, *Striga hermonthica* (Sh) の ShHTL/KAI2 と ShMAX2 の相互作用を検出する酵母 two-hybrid アッセイ(Y2H)系を構築することで、生理活性試験の迅速化も行った。しかしながら加水分解により D-OH を生成する SL 類は環境中で不安定であるために、実際の応用場面においては安定型自殺発芽誘導剤を開発することが実際の応用面では重要であった。そこでエチレンの *Striga* 種子発芽促進活性に着目した。探索と構造展開を行い、安価に合成可能でエチレン受容体に作用して *Striga* 発芽促進効果を示す KUT15 を創出した。さらに根寄生雑草発芽誘導活性を指標とした化合物ライブラリー中からの探索を行い、根寄生雑草発芽誘導活性を示す化合物を複数見いだすことができた。これら化合物中には、ストリゴラクトン活性やエチレン活性を示す化合物だけでなく、どちらの活性も示さない新奇化合物も含まれていた。一方、SL による根寄生雑草発芽を木材燃焼時に発生するカリキンが阻害すること、その際の受容体は ShKAI2i であることを見出している。この現象を利用した被害低減も可能であると考えている。

root parasitic weeds, strigolactone, gibberellin

発表責任者：浅見忠男（asami@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3SY01-2
講演日時、会場：3 月 19 日 09:30～ C21 会場

# 根寄生雑草の種子発芽刺激物質の化学と自殺発芽誘導への応用

# Practicality of the suicidal germination approach for controlling root parasitic weeds

○杉本 幸裕[1,2]、滝川 浩郷[1,2] ([1]神大院農、[2]JICA/JST SATREPS)
○Yukihiro Sugimoto[1,2], Hirosato Takikawa[1,2] ([1]Kobe Univ., [2]JICA/JST SATREPS)

ストライガとオロバンキに代表される根寄生雑草は、宿主植物の根から分泌されるストライゴラクトン（strigolactone, SL）と総称される化合物を感受して発芽し、近傍の宿主植物根に接着・侵入して寄生を開始する。前者はイネ科作物、後者はナス科、マメ科、アブラナ科等様々な作物を宿主とし、いずれも微小な種子を大量に生産することから、世界各地で食料生産を阻害している。オロバンキはクロロフィルを持たない全寄生性である。ストライガは光合成を営む半寄生性であるが、自らの光合成によって獲得できるエネルギーは生存に必要なエネルギーの一部に過ぎない。SL に依存した種子発芽応答は、宿主から独立しては生存できない根寄生雑草が有する、宿主根の存在を確認してから発芽するという巧妙な生存戦略と考えられ、SL の構造多様性や構造と活性の相関は多くの天然物化学者の関心を集めてきた。化学的実体が明らかになり始めて間もなくから、宿主が存在しない畑に発芽刺激物質を人為的に施与することで、土壌中の根寄生雑草の種子を発芽させ自殺に追い込む、自殺発芽誘導の可能性が論じられてきた。様々な SL 類縁体が合成され、シャーレ内で発芽刺激活性が評価されてきたが、天然の SL と比べれば構造が単純な類縁体でも、大量に合成することは容易ではないため、実証試験の報告はほとんどない。

我々は天然 SL の構造を解明する傍ら、構造を大胆に簡略化した一連の SL 類縁体を合成し、シャーレ試験での活性の高さと合成の容易さを勘案して T-010 と名付けた化合物を選抜した。水和剤を調製してポットおよび圃場で自殺発芽誘導剤としての効果を検証した結果､提唱されて以来 40 年を経て、自殺発芽誘導による根寄生雑草の防除の有効性を圃場レベルで実証した。本シンポジウムでは、根寄生雑草の生活環を概説し、発芽刺激物質としての SL の化学を論じるとともに、自殺発芽誘導による根寄生雑草防除の有効性検証試験の詳細を紹介する。

strigolactone, root parasitic weed, suicidal germination

発表責任者：杉本　幸裕（yukihiro@kobe-u.ac.jp）

講演番号：3SY01-3
講演日時、会場：3 月 19 日 10:00～ C21 会場

# ストリゴラクトンの生合成と制御
# Strigolactone biosynthesis and its regulation

○山口 信次郎（東北大生命）
○Shinjiro Yamaguchi (Tohoku Univ.)

ストリゴラクトン（SL）は根圏において、共生・寄生の化学シグナルとしてはたらく一方、内生の植物ホルモンとして地上部の枝分かれ等を制御する。SL は発見当初より、その化学構造からテルペノイドであると考えられたが、生合成経路は長い間不明であった。2005 年に、阻害剤および突然変異体を利用した研究から、カロテノイドに由来することが示唆されたが、それ以上の情報は得られなかった。筆者らは、植物がもつ二つのイソプレンユニット生合成経路を、それぞれの経路に特異的な中間体の取り込み実験により $^{13}C$ 標識化し、LC-MS/MS および $^{13}C$-NMR により 5-deoxystrigol の標識率および標識箇所を解析した。その結果、D 環を含む全ての炭素骨格が、メチルエリスリトールリン酸経路に由来するイソプレンユニットから構成されていることが示唆された。

近年、組換え酵素を用いた *in vitro* での実験により、カーラクトン（carlactone）と呼ばれる生合成中間体が同定された。カーラクトンは、all-*trans*-β-carotene を出発物質として、異性化酵素である DWARF27（D27）と２つのカロテノイド酸化開裂酵素（CCD7、CCD8）により合成される。最近の研究により、カーラクトンはシトクロム P450 である MAX1 の基質であることが示された。これらの発見により SL 生合成経路の全体像が明らかにされつつある。

biosynthesis, strigolactone, plant hormone

発表責任者：山口信次郎（shinjiro@m.tohoku.ac.jp）

講演番号：3SY01-4
講演日時、会場：3 月 19 日 10:30～ C21 会場

# MAX1 と LBO により導かれるストリゴラクトン生合成経路

# Strigolactone biosynthesis pathway catalyzed by MAX1 and LBO

○野村 崇人[1]、米山 香織[1]、森 愛実[2]、謝 肖男[1]、秋山 康紀[2]、米山 弘一[1] ([1]宇都宮大、[2]大阪府立大)
○Takahito Nomura[1], Kaori Yoneyama[1], Narumi Mori[2], Xiaonan Xie[1], Kohki Akiyama[2], Koichi Yoneyama[1] ([1]Utsunomiya Univ., [2]Osaka Pref. Univ.)

ストリゴラクトン（SL）は根圏における根寄生植物とアーバスキュラー菌根菌の宿主認識シグナルとして働く。また、植物体内では枝分かれを抑制する植物ホルモンとして機能している。農業生産において重要な生理作用をもつ SL であるが、その生合成経路の全貌は明らかにされていない。SL 生合成酵素として、カロテノイドイソメラーゼの D27、カロテノイド酸化開裂酵素の MAX3（CCD7）および MAX4（CCD8）、シトクロム P450 の MAX1 （CYP711A）、2-オキソグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼの LBO が報告されている。D27, CCD7, CCD8 により、β-carotene は 2 環性の carlactone（CL）へ変換される（Alder et al., Science, 335: 1348-1351, 2012）。これまでに我々は、シロイヌナズナの SL 生合成経路において、MAX1（CYP711A1）は CL の C-19 位を酸化して carlactonoic acid（CLA）を生成する酵素であることを明らかにしている（Abe et al., PNAS, 111: 18084-18089, 2014）。一方で、イネの MAX1 ホモログの一つである Os900（CYP711A2）は、CL から 4 環性の 4-deoxyorobanchol（4DO）への変換を触媒することが報告された（Zhang et al., Nature Chem Biol, 10: 1028-1033, 2014）。我々は、MAX1 酵素の多様性を調べるために、イネ、トウモロコシ、トマト、エンドウ、ポプラ、ストライガなどの MAX1 ホモログについて CL の代謝実験を行った。その結果、CL から CLA への変換は共通反応であり、CL から 4DO への変換を行うものは限られたホモログだけであった。したがって、多くの植物では MAX1 によって CL から 4 環性の SL へ直接向かわず、2 環性の CL 誘導体として進む生合成経路の存在が示唆された。実際にシロイヌナズナやイネなどからは CLA の他に CLA のメチルエステル体である methyl carlactonoate（MeCLA）が内生物質として検出される。さらに我々はシロイヌナズナの LBO の基質は MeCLA であることを明らかにした（Brewer et al., PNAS, 113: 6301-6306, 2016）。LBO は MeCLA に水酸基を付加するが、トマトやエンドウなどの LBO ホモログも MeCLA から同じ酸化代謝物を生成することを確認した。また、その代謝物はシロイヌナズナの *max1* や *lbo* 変異体からは検出されず、SL 受容体遺伝子 *AtD14* の変異体において蓄積していることを発見した。これらの結果から、植物には 4 環性 SL の生合成経路の他に MAX1 と LBO により導かれる 2 環性 SL の生合成経路が存在することが明らかとなった。

strigolactone, biosynthesis, enzyme

発表責任者：野村崇人（tnomura@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：3SY01-5
講演日時、会場：3 月 19 日 11:00～ C21 会場

寄生植物ストライガのストリゴラクトン受容体を制御する人口アゴニストの開発
A synthetic stimulant for seed germination in a parasitic plant Striga
○土屋 雄一朗、浦口 大輔、Satiyanarayanan AM、桑田 啓子、吉村 柾彦、萩原 伸也、伊丹 健一郎、大井 貴史、木下 俊則 (名大)
○ Yuichiro Tsuchiya, Daisuke Uraguchi, AM Satiyanarayanan, Keiko Kuwata, Masahiko Yoshimura, Shinya Hagihara, Kenichiro Itami, Takashi Ooi, Toshinori Kinoshita (Nagoya U.)

ハマウツボ科の寄生植物ストライガ（Striga hermonthica）は、アフリカにおいて穀物生産に甚大な被害を与え、飢餓や貧困と行った食糧問題を引き起こす有害雑草として知られている。ストライガは、宿主となる植物が土中に放出するストリゴラクトンを認識して発芽を起こすことが知られていたが、その機構、特にストリゴラクトン受容体については長年不明であった。我々は、ストリゴラクトン受容体の機能を可視化する蛍光ターンオン分子「ヨシムラクトン」を開発し、これを利用してストリゴラクトン受容体の同定に成功した。本発表では、この情報を元に開発した受容体の機能を制御する人工アゴニストについて発表する。ストライガを強制的に発芽させ、枯死させるる薬剤を開発することで、ストライガの被害を軽減できると考えられる。

Striga, strigolactone, receptors

発表責任者：土屋雄一朗（yuichiro@itbm.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3SY01-6
講演日時、会場：3 月 19 日 11:30～ C21 会場

# New Insights into Carlactone Biosynthesis and Application

Xiujie Guo[1], Mark Bruno[2], Sophia L. Samodelov[2], Lina Baz[1], Jamil Mohammed[1], Boubacar Kountche[1], Kun-Peng Jia[1], Valentine Ntui[1], Sandro Ghisla[3], Tadao Asami[4], Matias D. Zurbriggen[2], ○Salim Al-Babili[1] ([1]KAUST, [2]Univ. Düsseldorf, [3]Univ. Konstanz, [4]Univ. Tokyo)

Strigolactones (SLs) are a novel class of plant hormones regulating several developmental processes. SLs were originally identified as germination stimulants of root parasitic weeds, such as *Striga* spp., that cause enormous yield losses in different crops, including cereals, nightshades, legumes and sunflower. In additions, SLs induce hyphal branching in mycorrhizal fungi, an important step in establishing the beneficial mycorrhiza symbiosis. SL biosynthesis is initiated by the all-*trans*/9-*cis*-isomerization of β-carotene, followed by a stereospecific cleavage of 9-*cis*-β-carotene. This reaction leads to a 9-*cis*-configured intermediate that is converted into carlactone, the central metabolite in the biosynthesis of SLs. The complex structure of carlactone is not easily deducible from its precursor and is thus formed via a poorly understood series of reactions and molecular rearrangements, all catalyzed by only one enzyme, the carotenoid cleavage dioxygenase 8 (CCD8). To shed light on these reactions, we used recombinant CCD8 along with $^{13}C$ and $^{18}O$ labelling to produce carlactone. The characterization of the resulting compound by NMR and the identification of a second product expected to arise along with carlactone, allowed us to formulate a minimal reaction mechanism for carlactone. Previously, we demonstrated that carlactone is active as germination stimulant of *Striga* seeds. This activity led us to design carlactone-based analogs, such as Nitro-phenlactone that showed reasonable activity in restoring developmental phenotypes caused by SL deficiency and in inducing seed germination in the root parasitic plant *Phelipanche ramosa*. This result encouraged us to develop a new series of carlactone-based compounds which show very high activity in different SL functions. Some of these compounds are readily hydrolyzed by the highly sensitive SL receptor ShHTL7 of *Striga hermonthica* and are very active in inducing seed germination in this parasitic plant. Thus, they are very promising candidates for application as SL analogs that can be used in research, agriculture and to combat root parasitic weeds by inducing suicidal germination. In a different project, we have developed a genetically encoded biosensor (StrigoQuant), to quantify the activity of natural and synthetic SLs and to decipher the signaling pathway. StrigoQuant) is a protoplast-based ratiometric sensor that enables the measurement of SL activity at nanomolar concentrations, opening up the possibility of precise determination of structure/stereochemistry activity relationship and is a promising tool for investigating the role of different SL signaling components. StrigoQuant can be also further developed for high throughput screening for SL analogs and inhibitors of SL signaling.

carlactone, root parasitic weed, strigolactone

発表責任者：Salim Al-Babili（Salim.Babili@KAUST.EDU.SA）

講演番号：3SY02-1
講演日時、会場：3 月 19 日 09:05～ C22 会場

# 腸管免疫へのプロローグ：食物繊維と腸管構成細胞との相互作用

# The intestinal immune system, Prologue: Interaction between dietary fiber and intestinal cells

○矢部 富雄（岐阜大応生科）
○Tomio YABE (Gifu Univ.)

腸管絨毛は，摂取した食品中の栄養成分を効率よく吸収する機能を担うと同時に，食品に含まれるさまざまな物質と相互作用することによって栄養吸収以外の生理機能を発揮している可能性が推察される。そこで私たちは，腸管絨毛により吸収されることのない水溶性食物繊維と腸管との相互作用に注目し，その作用機序を研究している。

水溶性食物繊維の一種であるペクチンは，ほとんどすべての陸生植物の細胞壁と中葉組織とに偏在している。ペクチンは主に，D-ガラクトピラノシルウロン酸がα1,4-グリコシド結合した直鎖状のポリマー単位からなるが，α-L-ラムノシル残基をはじめとする中性糖も約 20%含まれ，種や組織によってその構造は大きく異なっている。近年の報告から，腸管がペクチンの多糖構造を認識している可能性が示唆されるものの，いまだに具体的なペクチン認識機構は証明されていない。そこで私たちは，ペクチンが生体内で示す広範な機能性の一端は，腸管によるペクチン認識機構を介してもたらされるという仮説を提唱し，これを証明しつつある。

私たちはこれまでに，ペクチンがフィブロネクチン（FN）$III_1$ フラグメントと相互作用し，上皮細胞表面のヘパラン硫酸糖鎖（HS）の構造を変化させることを見出した。そこで，細胞内へ FN 刺激を伝える際に重要なインテグリン受容体を介したシグナル伝達系について解析したところ，ペクチンは FN とα5β1 インテグリンを介して HS の硫酸化構造を変化させることが示された。また，培養細胞にペクチンを投与した後に細胞表面の HS を回収し，小腸上皮の成長に必要な Wnt タンパク質との結合力の変化を SPR 法により解析したところ, ペクチンにより HS の硫酸化構造が変化し，これにより成長因子 Wnt-3a と HS の結合力が著しく減弱することを発見した。さらに，ペクチンがマクロファージ細胞の炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響を調べたところ, TLR4 リガンドの LPS 刺激のみならず，TLR1/2，2/6，9 リガンドで刺激した場合においても，IL-6 産生量がペクチン添加濃度依存的に低下した一方で，TLR4 の細胞表面発現量に有意な変化はみられなかった。このことから，ペクチンは TLR-MyD88 シグナル経路を直接制御している可能性が示唆された。

〈参考文献〉

1) Nishida, M., *et al*., *Biosci. Biotechnol. Biochem*., 78, 635-643, 2014.
2) Nishida, M., *et al*., *Glycoconj. J.*, 32, 153-159, 2015.

intestinal cell, dietary fiber, villus

発表責任者：矢部富雄（yabet@gifu-u.ac.jp）

講演番号：3SY02-2
講演日時、会場：3 月 19 日 09:35～ C22 会場

# 腸管上皮細胞のα1, 2-フコシル化は免疫細胞によって調節される

# Intestinal epithelial α1, 2-fucosylation is regulated by immune cells

○後藤 義幸[1,2] ([1]千葉真菌、[2]東大医科研)
○Yoshiyuki Goto[1,2] ([1]Chiba Univ., [2]Univ. Tokyo)

腸管は、食餌性抗原や病原・非病原性細菌など多種多様な外来抗原に恒常的に曝されている特殊な器官である。腸管を覆う一層の上皮細胞は、これらの抗原に対し物理的、免疫学的な第一線の防御バリアを形成している。腸管上皮細胞は、細胞表面にさまざまな糖鎖を発現しており、中でも 2 型フコース転移酵素（Fucosyltransferase 2: Fut2）を発現することで、糖鎖の末端にα1, 2-フコースを付加していることが知られている。腸管上皮細胞が発現するα1, 2-フコースは、*Bacteroides* などの腸内細菌に資化されるのみならず、細胞壁の構成成分であるフコシル化莢膜多糖の合成やフコースオペロンを介した遺伝子発現制御などに利用されるため、宿主と腸内細菌間における共生因子の一つと考えられている。また、ヒトにおいて FUT2 の不活性型変異多型は、クローン病や I 型糖尿病、原発性硬化性胆管炎など様々な炎症性疾患の関連遺伝子として報告されている。そのため、腸管上皮細胞が発現する Fut2 およびα1, 2-フコースの誘導・制御機構を明らかにすることは、医学的・生物学的に重要な課題となっている。

本研究では、腸管上皮細胞における Fut2 の発現ならびにα1, 2-フコシル化誘導・制御機構の解析を行い、セグメント細菌を含む腸内細菌が上皮細胞のα1, 2-フコシル化の誘導に必要であることを見出した。さらに、腸管粘膜固有層に存在する自然免疫担当細胞の一つ、3 型自然リンパ球（Group 3 innate lymphoid cells: ILC3)が腸内細菌依存的に IL-22 を産生することで、上皮細胞の Fut2 およびα1, 2-フコシル化を誘導することを見出した。一方、獲得免疫担当細胞の一つである CD4 陽性 T 細胞は、IL-10 を産生することで上皮細胞のα1, 2-フコシル化を負に制御していることも明らかとなった。Fut2 欠損マウスは、病原性細菌である *Salmonella typhimurium* の感染に対し感受性を示すことから、腸管上皮細胞の Fut2 ならびにα1, 2-フコースは、*S. typhimurium* の感染に対して防御的な役割を担っていることが示された。以上の結果から、ILC3 と CD4T 細胞は腸管上皮細胞のα1, 2-フコースの発現を正および負に調節することで、腸内細菌との共生や病原性細菌の感染を制御し、腸管の恒常性維持に寄与していることが考えられる。

Commensal bacteria, α1, 2-fucose, Group 3 innate lymphoid cells

発表責任者：後藤　義幸（y-gotoh@chiba-u.jp）

講演番号：3SY02-3
講演日時、会場：3 月 19 日 10:15～ C22 会場

# 腸内細菌による T 細胞誘導

# Induction of T lymphocytes by gut microbiota

○田之上 大[1,2] ([1]理研 統合生命医科学研究センター、[2]慶應大)
○Takeshi TANOUE[1,2] ([1]RIKEN IMS, [2]Keio Univ.)

消化管には膨大な種類の腸内常在菌がダイナミックな平衡状態を保って生息していて、難分解性多糖の代謝や有害物質の解毒など様々な生理機能に大きな役割を果たしている。一方、昨今の研究により腸内常在菌が消化管免疫系の発達・成熟にも強く影響することが明らかになってきた。消化管粘膜には多様な免疫細胞から成る非常にユニークな免疫系が構築されていて、我々はそのなかでも T 細胞を題材に、その分化・誘導と腸内常在菌との関わりを研究している。具体的には、消化管に集積している T 細胞サブセット(TH17 細胞、Treg 細胞など)にフォーカスし、それぞれを強く誘導するマウスおよびヒトの腸内常在菌種を同定・単離してきた。また、これらの単離細菌株を用いた疾患治療応用についても検討を行っている。本パートでは、腸内常在菌による T 細胞誘導について、私たちの研究を中心に紹介する。

gut microbiota, Treg, TH17

講演番号：3SY02-4
講演日時、会場：3 月 19 日 10:45～ C22 会場

# 腸管炎症抑制における膜型 ATP 分解酵素の役割

# Regulation of ATP-mediated intestinal inflammation

○香山 尚子、竹田 潔（大阪大学大学院医学系研究科）
○Hisako Kayama, Kiyoshi Takeda (Graduate School of Medicine, Osaka Univ.)

アデノシン三リン酸(ATP)がアデノシン二リン酸(ADP)とリン酸に加水分解されることで生じるエネルギーは生物の生命活動維持において必須であり、細胞内 ATP は、筋収縮・DNA 合成・タンパク質リン酸化/分解・代謝反応などに寄与する。一方、P2X 受容体や P2Y 受容体を介してシグナル伝達分子として機能する細胞外 ATP は、神経伝達において重要な役割を果たすこと、免疫細胞に作用し炎症応答を誘導することが明らかとなっている。腸管腔内には、腸内細菌により分泌される細胞外 ATP が豊富に存在し、粘膜固有層内 Th17 細胞の分化を誘導する。炎症性腸疾患の患者では、腸内細菌叢の変化が見られるとともに Th17 応答が亢進すること、病原性細菌が高い ATP 産生能を有することより、腸管腔における ATP 濃度の適切な制御が腸管恒常性維持に必須であることが示唆される。本講演では、腸管組織に高発現する膜型 ATP 分解酵素による腸管炎症制御メカニズムについて最新の知見を紹介したい。

ATP, Epithelial cell, Intestinal homeostasis

講演番号：3SY02-5
講演日時、会場：3 月 19 日 11:15～ C22 会場

# 腸内環境から考えるヘルスサイエンスの最前線
# Gut environment for the maintenance of human health

○國澤 純[1,2,3,4] ([1]医薬健栄研、[2]東大医科研、[3]阪大医・薬・歯、[4]神戸大医)
○Jun Kunisawa[1,2,3,4] ([1]NIBIOHN, [2]Univ Tokyo, [3]Osaka Univ, [4]Kobe Univ)

腸は食べ物の消化や吸収を介し、生体に栄養を供給する組織であるが、同時に生体内の半分以上の免疫細胞を有する最大の免疫臓器でもある。近年、腸管に存在する免疫システムの理解が進んだこともあり、腸管免疫の機能を適正に保つことが、生体全体の免疫学的恒常性の維持だけではなく、免疫以外の生体応答を介した健康維持にも重要であることが知られるようになってきた。腸管免疫は、免疫の基本機能である感染症に対する生体防御を示し、食中毒などの予防や重篤化抑制に働く。また同時に腸管免疫は、腸内フローラや食事成分に対する恒常性維持にも重要な役割を担っており、その破綻はアレルギーや炎症性疾患の発症とも強く関連している。また腸内フローラや食事は腸管免疫の制御においても重要である。次世代シークエンサーや質量分析といった分析技術の発展もあり、腸内フローラや食事を介した腸管免疫の制御、さらにはそれに連動する健康との関連について、分子、細胞、個体レベルでその詳細が解き明かされつつある。本講演では脂質やビタミンといった食事成分や腸内フローラを介した免疫制御に関する研究成果とその知見を応用した機能性食品やワクチンの開発、創薬などの展開、さらにはヒトの健康との関連について、私たちが新たに取り組んでいる研究も含め、最新の知見を紹介したい。

Commensal bacteria, Diet, Intestinal immunity

発表責任者：國澤　純（kunisawa@nibiohn.go.jp）

講演番号：3SY03-1
講演日時、会場：3 月 19 日 14:05～ C16 会場

# 食品因子センシングからみた日本食素材の機能性
# Functionality of Japanese food materials in view of food factor sensing

○立花 宏文 (九大農)
○Hirofumi Tachibana (Kyushu Univ.)

ポリフェノールなどに代表される食品因子の機能性発現において、生体が食品因子を感知すること、すなわち食品因子センシングが重要な役割を担っている。これまでに食品因子センシングに関与する生体分子が数多く同定されており、それらの発現量は食品因子の機能性発現に深く関与することが明らかにされつつある。本講演では日本食素材や日本型食事パターンの食品因子センシング関連遺伝子の発現調節作用や食品因子センシングに基づいた食品因子の組み合わせ効果について紹介する。

**日本食素材の食品因子センシング調節作用**

日本食素材として米、昆布だし、鰹だしをマウスに投与し、食品因子センシング関連遺伝子発現に対する影響を検討したところ、いずれにおいても多くの遺伝子の発現量が増加し、低下する遺伝子は少数であった。緑茶のヒト介入試験において食品因子センシング遺伝子発現量を測定したところ、緑茶摂取群において、複数の食品因子センシング遺伝子の発現量が介入開始時に比べ介入終了時において高値を示した。

**食品因子センシングからみた日本型食事パターンの効果**

日本型の食事パターンは機能性の側面からも我が国の健康長寿を支えてきたと考えられているが、その科学的エビデンスは乏しい状況にある。ここでは日本型と欧米型の食事パターンならびに各食事パターンを構成する食素材や成分の食品因子センシング調節作用について紹介する。

**食品因子センシングに基づいた食品機能の増強**

緑茶ポリフェノールの一種であるエピガロカテキンガレート(EGCG)は緑茶の多彩な生体調節作用を担っている。その生理作用発現の多くに 67kDa ラミニンレセプター（67LR）が EGCG センサーとして関与している。all-*trans*-retinoic acid(ATRA)は 67LR 発現量ならびに EGCG の細胞表面結合量を増加させることで EGCG の腫瘍成長抑制作用を増強する。また、柑橘ポリフェノールとして知られるエリオジクチオールは 67LR を介した EGCG センシングを増強することで EGCG の抗がん作用や脂質代謝改善作用を高める。米糠成分トコトリエノールは、フラボノイドの一種であるバイカレインのセンサー分子芳香族炭化水素受容体(AHR)の発現量を増やすことでバイカレインの細胞増殖抑制作用を増強することを見出した。

Food factor sensing, Japanese foods, Food combination

発表責任者：立花宏文（tatibana@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3SY03-2
講演日時、会場：3 月 19 日 14:30～ C16 会場

# 清酒酵母の新しい機能 －睡眠の質改善作用－

# Japanese sake yeast improves the quality of sleep

○物井 則幸（ライオン(株)機能食研)
○Noriyuki Monoi (Lion Corp.)

睡眠は生活時間の約 3 分の 1 を占め、大脳の休息、さらには心身の修復・回復や翌日の活動に備えた体内環境の整備など生活の質を維持・向上させるために不可欠な生理現象である。現代社会では睡眠時間の短縮や夜型化などの生活スタイルの変化により、睡眠に不満を持つ人の割合が徐々に増加し、成人の 60%以上が何らかの睡眠問題を有すると報告されている。限られた睡眠時間の中で、健康を維持し日中の活動度を高めるため、深い眠りの割合を増やし、睡眠の質を向上させる工夫が求められている。

このような背景の下、我々は睡眠の質の向上を目指した素材探索を行い、80 種の食品素材の中から清酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae sake*)を見出した。清酒酵母は、動物モデルの脳波解析において、深い睡眠であるノンレム睡眠量の増大機能を示した。また、ヒト試験において、清酒酵母摂取により、睡眠の深さを示すデルタ波パワー値（脳波解析）がプラセボ摂取と比較して有意に増加すること、成長ホルモンの分泌量が有意に上昇すること、および主観評価の「起床時の眠気」が有意に改善することを確認した。作用メカニズムを解析する狙いで、動物モデルにおいてアデノシン $A_{2A}$ 受容体選択的アンタゴニストを投与した結果、清酒酵母による深睡眠増大作用がアンタゴニストにより顕著に抑制されることが分かった。したがって、清酒酵母はアデノシン $A_{2A}$ 受容体を介して睡眠を改善すると考えられる。

以上、本報では日本酒の製造に用いられると共に、古来より甘酒、わさび漬け、粕汁など酒粕を利用した食品として食されてきた「清酒酵母」の新しい機能として睡眠の質改善作用を紹介する。

sleep, sake yeast, *Saccharomyces cerevisiae*

講演番号：3SY03-3
講演日時、会場：3 月 19 日 14:55～ C16 会場

# 食品の香り・フレーバー研究の農芸“脳”科学

Food scents and flavors from a "neuro-food science" perspective

○岡本 雅子、東原 和成（東大農）
○Masako Okamoto, Kazushige Touhara (Univ. Tokyo)

香りは食品の二次機能の一つである。発酵食品は、微生物の働きにより産生された複雑な香りが重要な魅力のひとつとなっている。こうした香りの本体を明らかにすることは、発酵食品の感覚特性を評価する上でも、また香料の作製などにより香りを再現し、広く活用する上でも重要である。

現在、香気物質の同定によく使用されるのは、匂い嗅ぎガスクロマトグラフィー（GC-O）と呼ばれる分析法である。GC-O では、分離された香気物質を、機器だけでなく、ヒトの鼻でも検出する。香りの元となるのは揮発性物質だが、すべての揮発性物質がヒトに香りを感じさせるわけではない。またヒトの鼻は鋭敏であり、機器の検出限界を下回る濃度でも、香りとして知覚する。そこで機器分析とヒトの鼻の双方での分析が必要となる。一般に食品は数百種類の揮発性物質を含むが、訓練を積んだフレーバリストが GC-O を用いると、香りを特徴づける主要香気物質を 20-30 種類程度にまで絞り込むことが出来る。しかし、発酵食品のように多数の香気物質から構成される複合臭の場合には、GC-O を使っても香りの本体を十分に捉えることが出来ない場合がある。複合臭では、香気物質同士の相互作用が香りの質に影響する。例えば単体では香りに寄与しない物質でも、他の香気物質が嗅覚受容体に結合するのを妨げるなどにより香気に影響を及ぼす場合がある。その上複雑な香りの知覚には、食経験など、香りに関する経験の影響が大きいことが指摘されている。例えば訓練を積んだフレーバリストと、実際に食品を楽しむ消費者では、ある食品から感じる香りの印象、言い換えればその人にとっての「香りの本体」が異なる可能性がある。

こうした点を考慮して当研究室では、脳の反応を指標とした香りの評価を試みている。香りの知覚をコードしているのは脳の活動パターンであるため、原理的には、本物の食品のヘッドスペース（その食品が発するすべての揮発性物質が含まれる）に対する脳の活動のパターンに近い反応を示す香気物質群が、その食品の「香りの本体」と言える。実際には、ヒトの脳活動を計測する技術には制約があり、ヒトで詳細な神経活動パターンを調べることは難しい。そこで匂い物質の相互作用の影響を評価する目的では、モデル系としてマウスを用い、マウスの香り知覚と嗅球イメージングの活動パターンの対応づけを行っている。一方、経験や文化を考慮したヒトでの香りの感じ方の評価には、ヒト脳機能イメージング法を用い、本人が感じる香りの印象と脳活動の対応付けを行っている。本演題ではこのような、従来以上に嗅ぐ側の要因を加味した、脳を指標とした香りの研究を紹介する。

odor, flavor, brain

発表責任者：岡本雅子（a-okmoto@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3SY03-4
講演日時、会場：3 月 19 日 15:20～ C16 会場

# 和食を支えるだしの秘密に迫る～おいしさ、健康、そして食育へ～

# Unveil the beneficial effects of dashi on palatability, health and dietary education

○近藤 高史（味の素（株）イノベ研）
○Takashi Kondoh (Ajinomoto Co., Inc.)

日本人は世界的にみて肥満者の割合が低く、健康寿命は男女共に世界一を誇る。その理由として、日本の食事（和食／日本食）が大きな役割を果たしているとされ、世界的な注目を集めている。しかし、健康価値を裏付ける科学的エビデンスは少ない。

和食の味付けの基本はだしである。海外ではフォン、ブイヨン、湯（タン）などの液体調味料が使われているが、いずれも生の素材（牛肉、鶏肉、骨など）を基本に、野菜や香辛料を加えて長時間煮込んだものが多い。それとは対照的に、日本のだしは、かつお節や昆布などの乾燥させた素材を用い、水またはお湯を使って好ましい成分を短時間でかつ最大限に引き出すという大きな特徴がある。この素材や成分抽出方法の違いが、健康機能性に差異を生み出す可能性が考えられる。そこで、本研究では「だしが、おいしさを付与するのみに止まらず、和食の健康価値に大きく貢献している」と仮説を立て、日本で広く用いられているかつおだしを研究素材に選び、嗜好性と健康機能について調べた。

かつおだしの主成分は酸味成分および苦味成分であり、うま味成分であるイノシン酸を約 3%含んでいるが、糖、脂質、グルタミン酸は微量である。香りについても多くの日本人が好むのと対照的に、海外の人は魚臭い・生臭いと嫌う傾向が強い。したがって、なぜかつおだしが和食の味付けに欠かせないかについて「好ましい味や香り」で説明することが困難である。マウスおよびラットを用いて嗜好性を調べた結果、かつおだしの摂取体験に基づきかつおだしの嗜好性が著しく増加することを見出した。この知見は、摂取に伴う健康効果を学習した結果、かつおだしの嗜好性が高まる可能性を示唆する。そこで、健康な大学生を対象にかつおだし摂取後の機能性について調べたところ、コントロール群に比べて胃運動が促進し、満腹感が高まり、空腹感が減少することを見出した。その一方で、食物の胃排出速度は遅くなることがわかった。さらに、空腹状態のマウスを用いた実験では、油脂の摂取量がかつおだし共存下で著しく減少した。これらのメカニズムは不明であるが、肉を使わない典型的な和食において、「野菜などに含まれる少量のタンパク質をできる限り多く消化するために、胃排出口の幽門括約筋を収縮させて胃内により長い時間食物を貯留させると共に、胃運動を促進することが合理的である」という推論と一致する。上記以外にも、マウスやラットを用いた実験において、攻撃性の低下、うつ／不安の抑制など、情動面における改善効果が認められた。さらに、かつおだしの継続摂取によって、さまざまな脳部位におけるパルブアルブミン（ガンマアミノ酪酸（GABA）作動性神経の中でも約 25%の特定サブタイプだけに共発現する $Ca^{2+}$結合性の小分子量アルブミン）の陽性細胞数が増加した。本講演では、日本の主要な伝統的液体調味料である「かつおだし」を用いた最先端の科学的研究知見について解説する。

*dashi*, palatability, health

発表責任者：近藤　高史（takashi_kondoh@ajinomoto.com）

講演番号：3SY03-5
講演日時、会場：3 月 19 日 15:45～ C16 会場

# 慢性拘束ストレス負荷による脳機能低下に対する味噌摂取による改善効果

# Miso ingestion improves chronic restraint stress-induced brain dysfunction

○瀬尾 誠（福山大薬）
○Makoto SEO (Fukuyama Univ.)

現代社会は精神的ストレスに曝される機会が多く、日常生活と関連性の高い精神・身体的ストレスに起因する精神疾患は、糖尿病や動脈硬化症などの生活習慣病と同等のカテゴリーに属すると認識されているだけでなく、生活習慣病の発症に至ることも知られている。物理的・身体的ストレスや心理的ストレスを受けると、視床下部–脳下垂体–副腎皮質系（hypothalamo-pituitary-adrenal axis：HPA 系）が活性化され、副腎皮質ホルモンが放出されるのであるが、副腎皮質ホルモンの過剰分泌により、海馬の神経細胞の変性が認められることも知られている。よって、慢性的ストレス負荷や副腎皮質ホルモンの過剰分泌は、海馬の形態的・機能的変化をもたらし、学習・記憶に対して悪影響をおよぼすと考えられている。これまでに生体に有益な生理機能を数多くもたらす食品の代表である大豆の摂取によって、学習・記憶促進作用や神経細胞新生の増加、さらに小胞体ストレスによる神経変性疾患の抑制効果が報告されているが、その発酵食品である味噌摂取による精神的ストレスに対する効果の検証はこれまで行われていない。そこで本研究では、マウスに慢性拘束ストレス（CRS）負荷した際の脳機能低下に対し、味噌摂取により改善効果が認められるかを検証した。

C57BL/6 マウスに、ヒトが一日一杯の味噌汁を摂取した際の味噌量と同等となるように味噌サンプル溶液を飲水中に添加して 4 週間の前投与を行った後、一日当たり 3 時間の身体的拘束を 3 週間連日施した。最終日に採血および灌流固定した脳を採取して凍結組織切片を作製し、神経細胞およびアストロサイトのマーカータンパク質、神経栄養因子、グルココルチコイド受容体およびアポトーシス陽性細胞の変化を指標とした評価を行った。その結果、CRS 負荷により顕著な体重減少および血清中コルチコステロン濃度の上昇が認められたのであるが、味噌摂取により体重減少率の軽減ならびに血清中コルチコステロン濃度の低下が認められた。また CRS 負荷により神経細胞の脱落および神経栄養因子の減少が認められたのであるが、味噌摂取により歯状回の顆粒細胞層における神経細胞およびアストロサイトの増加と神経細胞の突起伸長の回復が認められ、さらに神経栄養因子の発現量の増加が認められた。さらに CRS によるアポトーシス陽性細胞の増加は、味噌摂取により顕著に減少することが認められた。これらの結果より、日常的な味噌の摂取は強いストレス環境下に曝された際のストレスを軽減するだけでなく、脳、特に海馬領域において神経栄養因子発現量を増加させ、神経細胞を正常に維持することで脳機能低下を改善する効果があることが示唆された。本シンポジウムでは、CRS 負荷したマウスに味噌摂取させた際の行動変化についても紹介したい。

Miso, Stress

発表責任者：瀬尾誠（seo@fupharm.fukuyama-u.ac.jp）

講演番号：3SY03-6
講演日時、会場：3 月 19 日 16:10～ C16 会場

# 伝統的発酵食品の亜鉛欠乏予防効果 -有用因子の探索と同定-

# Prevention of zinc deficiency by traditional fermented food products: searching and identifying suitable components

○神戸 大朋（京大生命科学）
○Taiho Kmabe (Kyoto Univ.)

近年、味噌などの伝統的発酵食品の健康機能に注目が集まっている、その効能を分子レベルで実証した報告は必ずしも多くない。我々は、必須微量栄養素の一つである亜鉛をキーワードにして、伝統的発酵食品の効能に関して研究を進めている。

亜鉛は、体内では、鉄に次いで多量に存在する必須微量栄養素である。成人での体内亜鉛量は 2~3g と微量であるが、タンパク質の構造因子や酵素の補因子、シグナル調節因子として機能しており、創傷治療や味覚・免疫・神経機能の制御など、その機能は多岐にわたる。したがって、亜鉛は健康の維持・増進に不可欠な要素となり、欠乏すると様々な欠乏症を引き起こす。亜鉛は、一日に 8～10 mg 程度摂取することが推奨されているが、消化管における吸収効率は 30%程度と低く、この値は、摂取亜鉛量の増加や加齢に伴い低下する。近年、十分な栄養素が摂取できる状況にある先進国においても、乳幼児や高齢者を中心に潜在的亜鉛欠乏者の数が増加しており、日本においては、国民の 20~30%が亜鉛欠乏傾向にあるとの試算もなされている。亜鉛を日々の食事により充足する意義は大きいが、亜鉛の含有量は一般的には肉類に多く、穀物や野菜類に少ないため、欧米食に比べると日本食の亜鉛含量は高くない。よって、我々は、日本食には亜鉛吸収を高めるような因子が含まれているとの仮説を立てて研究を実施しており、特に、代表的な伝統的発酵食品である味噌を対象として、亜鉛吸収を促進する因子が存在するか解析を実施している。

消化管における食事由来の亜鉛の吸収には亜鉛トランスポーターZIP4 が機能しており、ZIP4 は消化管上皮細胞においては管腔側のアピカル膜に局在する。ZIP4 の発現量は、亜鉛レベルによって厳密に制御されており、亜鉛が欠乏するとアピカル膜に蓄積する一方で、十分時には、アピカル膜からエンドサイトーシスされ、その後、速やかに分解される。ZIP4 を過剰発現させた培養細胞では、細胞内への亜鉛取り込み活性が有意に上昇することから、ZIP4 の発現を増加させる（＝分解を抑制する）食品因子は、消化管からの亜鉛吸収を促進させる活性をもつと考えられる。ZIP4 の発現変化を指標にして、味噌抽出物から ZIP4 発現増強活性を有する因子を探索した結果、味噌の主原料となる大豆抽出物から活性因子としてソヤサポニン Bb に ZIP4 の発現を増強する活性があることを見出した。ソヤサポニン Bb の ZIP4 発現増強活性は、ZIP4 の発現を促進させる活性ではなく、細胞膜上に発現する ZIP4 の恒常的な分解を抑制する活性であった。ソヤサポニン Bb を添加した細胞では、ZIP4 の発現増加に伴い、細胞内亜鉛量が増加することから、亜鉛吸収促進因子としての効果が期待できる。

Zinc, Soyasaponin, Miso

発表責任者：神戸大朋（kambe1@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3SY03-7
講演日時、会場：3 月 19 日 16:35～ C16 会場

# 味噌に含まれる抗ストレス成分の探索

# Search for anti-stress constituents from traditional Japanese fermented food “MISO”

中村 文彬[1]、川村 緑[1]、田中 万結[1]、石橋 信宏[1]、相馬 里奈[1]、波多野 絢香[1]、坂本 匠[1]、上杉 愛海[2]、菊水 健史[2]、新井 大祐[1]、塩田 邦郎[1]、○中尾 洋一[1] ([1]早大先進理工、[2]麻布大学)
Fumiaki NAKAMURA[1], Midori KAWAMURA[1], Mayu TANAKA[1], Nobuhiro ISHIBASHI[1], Rina SOMA[1], Ayaka HATANO[1], Takumi SAKAMOTO[1], Ayumi UESUGI[2], Takefumi KIKUSUI[2], Daisuke ARAI[1], Kunio SHIOTA[1], ○Yoichi NAKAO[1] ([1]Waseda Univ., [2]Azabu Univ.)

2013 年に“和食”がユネスコ無形文化遺産に登録されるなど、世界的にも日本食のおいしさやヘルシーさに注目が集まりつつある。日本人の平均寿命の長さに伝統的な日本食が関係している可能性は大いに考えられるものの、具体的に日本食に含まれるどのような成分が日本人の健康維持に貢献しているかについては、まだ検討の余地が残されている。本研究では、日本食と日本人の健康の関係を解明するために、日本食の特徴である発酵食品のひとつである味噌に着目し、そこに含まれる有効成分の探索研究を行った。

疾病罹患時に緊急に服用する医薬品と違って、長期的な摂取によって健康維持に関わると考えられる食品の有効成分はマイルドな生理活性を発揮すると考えられる。従って、医薬品と同じような強い活性を探索するための評価系によって評価しようとしても、食品からは有効な生理作用を見出すことは難しいと考えた。そこで、われわれの研究では食品の有効成分を探索する際の指標としてエピゲノム変化に着目し、さらにそのひとつであるヒストンの化学修飾の変化を指標とすることとした。ヒストンコアと呼ばれるヒストン 8 量体に DNA が約 2 回巻きついたクロマチンの最小単位であるヌクレオソームにおいて、ヒストンテールと呼ばれるヒストン分子の *N*末端部位に含まれるアミノ酸残基は、アセチル化、メチル化、リン酸化など様々な修飾を受け、それが遺伝子発現の調節に大きくかかわることが知られている。多くの慢性疾患では、この遺伝子発現パターンの異常、すなわちエピゲノムの異常が蓄積されていることから、体に良い食べ物にはヒストン修飾の異常を軽減するような作用があると考えられた。

われわれは、20 種類のヒストン修飾に対するモノクローナル抗体を用いたセルベースヒストン修飾アッセイシステムを構築し、これを用いて味噌中の有効成分を探索した。全国から集めた 117 種類の味噌サンプルを対象としてスクリーニングを行い、顕著なヒストン修飾変化を引き起こしたサンプルから活性本体を精製し、構造を明らかにした。得られた活性本体は味噌の発酵過程によってはじめて作り出される代謝産物であり、ヒストン H4 の 5 番目のリシン残基のアセチル化を抑制した。また、マウス ES 細胞を用いた神経細胞分化誘導系によって、本物質の細胞分化調節活性を調べたところ、アストロサイトへの分化誘導活性を見出した。さらに、マウスモデルを用いて本物質の抗ストレス活性を評価したところ、顕著な活性を見出すことができた。

epigenome, differentiation, traditional fermented food

発表責任者：中尾洋一（ayocha@waseda.jp）

講演番号：3SY04-1
講演日時、会場：3 月 19 日 14:05～ C21 会場

# 植物代謝成分の有用性解明に向けたマルチオミクス解析の方向性
# The direction of multi-omics analyses for the usefulness elucidation of the plant metabolites

○櫻井 望、柴田 大輔（かずさ DNA 研究所）
○Nozomu Sakurai, Daisuke Shibata (Kazusa DNA Res. Inst.)

ヒトの健康は食品に含まれる植物成分に左右されている。カナダのアルバータ大学が作る Human Metabolome Database では、ヒトの体内で検出されうる化合物として約 4 万種類が登録されているが、その約 9 割は摂取した食品由来とされており、多くのものは、もとをたどると植物に由来している。植物が生産する代謝産物の総数は、100 万種類以上にものぼると推定され、植物は、光障害や病害虫、乾燥ストレス等に対処する機能を発達させてきた。植物由来の代謝産物は、発酵・醸造の過程や腸内などで、微生物による変換を受ける。熱処理や長期保存などの食品加工では、メイラード反応などの化学的な変換も起こる。摂取後の体内では、抱合化反応などを受ける。このように、生物種を越えた様々な変換の結果として、代謝産物の多様性が形作られている。植物由来化合物のヒトに対する機能性を解明するために、網羅的な代謝産物解析（メタボローム解析）とヒト遺伝子機能解析によるマルチオミクス解析が期待されている。

私たちは、二次代謝産物の同定・推定のため、超精密質量分析を用いたメタボローム解析の技術開発を行ってきた。メタボローム解析の最大の課題は、いかに化合物の同定・推定率を高めるかである。同定に必要な精製標品の入手が限られているため、化合物の同定率は約 1 割程度と低い。我々は、推定率を高めるために、３つのアプローチをとってきた。１）ピーク検出の技術開発として、PowerGet ソフトウェアを開発した。小さいピークまで質量精度の高い検出ができ、データベース検索や組成式推定に重要な付加イオン（アダクト）の判定精度を高めた。２）構造推定技術開発として、多段階 MS を使ったフラボノイドの推定システム FlavonoidSearch を開発した。コンピューターでは予測の難しいフラグメント化について、専門家が手作業で約 7000 のフラボノイドの仮想 MS/MS フラグメントを構築したことで、推定確度を高めた。これにより、植物種間に共通する新たな修飾代謝経路が推定された。３）標品に代わる化合物推定結果の再利用のために、データベース化を進めた。再解析可能な生データ（MassBase）、ピーク情報のデータ（KomicMarket）、実験手法を書き留めるデータベース（Metabolonote）などを公開している。これらの開発技術を使うことで、検出された代謝物の由来を推定することが可能となってきた。各生物や食品などで、相互に比較可能なデータベースを構築することが、マルチオミクス解析において、代謝物の多様性を扱う際に重要と考える。

metabolomics, plant secondary metabolites, functional ingredients in foods

発表責任者：櫻井望（sakurai@kazusa.or.jp）

講演番号：3SY04-2
講演日時、会場：3 月 19 日 14:40～ C21 会場

# アスパラガスにおける含硫黄代謝物アスパラプチンの生合成機構の解明に向けた統合メタボロミクス

# Integrated metabolomics for revealing biosynthetic mechanism of S-containing metabolite asparaptine in Asparagus officinalis.

○中林 亮（理研 CSRS）
○Ryo Nakabayashi (RIKEN CSRS)

含硫黄代謝物は、植物界に普遍的に存在する代謝物の一群であり、ヒトに有益な活性を示すことが知られている。近年、アスパラガス（*Asparagus officinalis* L.）における含硫黄代謝物をターゲットとした高分解能メタボローム解析（S-オミクス）[1,2]により、血圧調節に関与するアンジオテンシン転換酵素（ACE）に対して阻害活性を示す新規代謝物アスパラプチン（asparaptine）が発見された[3]。アスパラガスにおいてアスパラプチンを含めた含硫黄代謝物の生合成機構の多くは明らかとなっていない。本研究では、統合メタボロミクス的手法によるアスパラプチン生合成遺伝子の同定を試みている。

一般に、特異的代謝物の生合成遺伝子の同定では、ある特定の部位における代謝物の蓄積パターンと生合成遺伝子の発現パターンの相関関係を利用する場合が多い。そこで、アスパラプチンの蓄積分布を理解するためにアスパラガス若茎におけるイメージング質量分析を行った。結果、アスパラプチンは葉と茎の組織の間の成長点において顕著に蓄積しており、その他の組織における蓄積はわずかであることが分かった。現在、アスパラプチンの高蓄積部位とそれ以外の部位における液体クロマトグラフィー質量分析を用いたメタボロミクスと RNA-seq を用いたトランスクリプトミクスを行い、生合成遺伝子の絞り込みを行っている。本講演では、一連の研究成果を詳細に紹介する。

参考文献

1. Nakabayashi et al., Anal. Chem. (2013)
2. Nakabayashi & Saito, Curr. Opin. Biotechnol. (2017)
3. Nakabayashi et al., J. Nat. Prod. (2015)

S-omics, asparaptine, integrated metabolomics

発表責任者：中林　亮（ryo.nakabayashi@riken.jp）

講演番号：3SY04-3
講演日時、会場：3 月 19 日 15:15～ C21 会場

植物トリテルペノイド生合成とその制御機構
Regulatory mechanisms of triterpenoid biosynthesis in plants
○關 光（阪大院・工・生命先端）
○HIKARU SEKI (Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

トリテルペノイドは 6 個のイソプレン単位からなる炭素数 30 の 2,3-オキシドスクアレンを共通前駆体とする化合物群である。トリテルペノイドには、カンゾウ（甘草）のグリチルリチンやオタネニンジン（人参）のジンセノサイドなどに代表される漢方原料（生薬）の主活性成分とされる化合物も多い。本講演では、トランスクリプトームデータを活用した非モデル植物からのトリテルペノイド生合成酵素遺伝子の探索やその発現制御機構に関する私たちの研究について紹介したい。

マメ科カンゾウの根およびストロン（地下茎）に特異的に蓄積する「グリチルリチン」は、肝炎治療剤、抗炎症剤、甘味料原料等として多用される最も重要な植物トリテルペノイドの一つである。私達は、カンゾウの地下茎を材料とする完全長 cDNA ライブラリーを構築し、これまでにグリチルリチンの生合成に関わる 2 種のシトクロム P450 モノオキシゲナーゼ、CYP88D6（β-アミリン 11 位酸化酵素）および CYP72A154（β-アミリン 30 位酸酵素）を同定し、これらの酵素遺伝子を利用したグリチルレチン酸（グリチルリチンの非糖部で、薬理活性本体）の合成生物学研究を進めている。

一方でカンゾウは、グリチルリチン以外にもソヤサポニン、オレアノール酸、ベツリン酸といった異なる複数種のトリテルペノイドを生合成するが、これらの異なるトリテルペノイドを「器官や細胞タイプごとにどのように作り分けるか」は厳密に制御されている。私達は、グリチルリチン含有量が高いウラルカンゾウ系統およびグリチルリチン含有量が低い系統の肥大根、グリチルリチンが検出されない地上部組織やグリチルリチン以外のトリテルペノイドを主に蓄積する組織培養ストロン組織など、様々な材料についてトランスクリプトームデータを取得し比較することで、それぞれのトリテルペノイド生合成酵素遺伝子の組織特異的な発現制御に関わる転写因子の探索を進めている。これまでに、グリチルリチンとは異なるトリテルペノイドであるソヤサポニンの生合成に関わる CYP93E3（β-アミリン 24 位水酸化酵素）遺伝子の転写活性化に寄与すると考えられる bHLH 型転写因子を同定している。また、私たちは最近、グリチルリチン含有量が高いウラルカンゾウ系統のドラフトゲノム解読に成功した。ゲノム情報が得られたことで、上記転写因子のインビボ結合部位のゲノムワイド解析やトリテルペノイド生合成遺伝子のエピジェネティック制御の可能性など、より包括的にトリテルペノイド生合成制御機構を解析することが可能になると考えられる。

plant triterpenoids, biosynthesis, transcriptome

発表責任者：關　光（hseki@bio.eng.osaka-u.ac.jp）

講演番号：3SY04-4
講演日時、会場：3 月 19 日 15:50～ C21 会場

# 植物ステロイドサポニン生合成の解析と植物代謝工学

# Investigation of steroidal saponin biosynthesis in plants

○水谷 正治 (神戸大院農)
○Masaharu Mizutani (Kobe Univ.)

植物が生産する膨大な数の生物活性物質には医薬品やその原料として利用されている化合物が多数あり、様々な研究グループがそれらの生合成遺伝子群の解明と代謝工学を進めている。植物個体あるいは植物組織培養を利用した植物代謝工学による有用物質生産の利点は、必要となる生合成系（生合成酵素や輸送蓄積系）のほとんどは既に植物細胞内に整っている点であるが、植物代謝工学の実用化は未だ発展途上である。本講演では、ジャガイモの α-ソラニン生合成能を有用サポニン生合成能へ「代謝スイッチング」させる植物代謝工学について、これまでの研究経過を紹介する。

ステロイドの 3 位水酸基に複数の糖が結合したステロイドサポニンは界面活性作用を有し、様々な生物活性を示す天然生理活性物質である。単子葉ヤマノイモ属（*Dioscorea*）にはアグリコンとしてジオスゲニンを持つジオシンが多量に蓄積しており、医薬用ステロイドの合成中間体として利用されている。ステロイドサポニンはコレステロールを前駆物質として、C-16、22、26 位の酸化、EF 環形成、C-3、26 位水酸基への糖転移など連続的な修飾により生合成されると推定されるが、生合成遺伝子および反応経路は不明である。本研究では、ヤマノイモ属のサポニン生合成遺伝子を同定することを目的とした。サポニン高生産種のトゲドコロ(*D. esculenta*)と、比較対象として低生産種のダイジョ(*D. alata*)を材料として、次世代シークエンサーによるトランスクリプトーム解析を行い、両者の発現量の違いから生合成候補遺伝子を複数選抜した。これまでに、組換え酵素を用いた機能解析によりコレステロールの 16 位、22 位、26 位を水酸化するシトクロム P450 とフロスタノール配糖体の 26 位-*O*-グリコシド結合を加水分解する β-glucosidase を同定した。現在、ステロイド配糖化に関わる遺伝子の同定に向けて、候補 UGT 遺伝子を選抜し、機能解析を進めている。

一方、ジャガイモには有毒ステロイドグリコアルカロイドである α-ソラニンが蓄積している。ジャガイモのソラニン生合成遺伝子を RNA 干渉法やゲノム編集により発現抑制した結果、有毒グリコアルカロイドを有用ステロイドサポニンへ「代謝スイッチング」することに成功した。現在、有用ステロイドサポニン生合成能をさらに増強する植物代謝工学を進めている。

本研究の一部は農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業の「作物における有用サポニン産生制御技術の開発」（シーズ創出ステージ）、「 高度機能分化した植物組織培養による有用サポニン生産技術開発 」（発展融合ステージ）、および、総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施した。

steroid, saponin, P450

発表責任者：水谷正治（mizutani@gold.kobe-u.ac.jp）

講演番号：3SY04-5
講演日時、会場：3 月 19 日 16:25～ C21 会場

# ムラサキのシコニン生産誘導系を用いたオミックス解析

# Omics studies on inducible shikonin production system in *Lithospermum erythrorhizon*

○矢崎 一史（京大生存研）
○Kazufumi Yazaki (Kyoto Univ.)

モデル植物を使った大規模な研究展開により、植物の基本的な生物学的機能に関するオミックス研究は飛躍的に進んだ。しかしその一方で、植物の特化代謝（二次代謝）産物には、植物種特異性の高いものも多く、化合物によってはモルヒネのようにほんの２、３種の植物種のみに含まれる有用物質もある。シロイヌナズナなどのモデル植物ではカバーできない有用天然物の生合成経路やその制御、さらには輸送や蓄積に関しては、依然大きな未解明領域の状態にある。実用に資する代謝研究を行うためには、やはりこうした個々の非モデル植物を対象にした研究が必要である。一方で、個別の非モデル植物では研究者人口が限られる、ゲノムが解読されていない等の理由でどうしても研究展開に制約が生じ、敷居が高くなっているのが実情である。本シンポジウムでは、こうした問題を抱えながら、我々が行っている薬用植物のムラサキを対象としたオミックス研究を紹介する。

薬用植物のムラサキは、「紫根」の漢名で古くから薬用や染料として用いられるムラサキ科の多年生草本である。その薬効成分であり赤色色素であるのがナフトキノン誘導体のシコニン類である。シコニン系色素は、ムラサキ科の中でも数種の限られた属でのみ生産される化合物で、高い脂溶性を示すこと、金属イオンと結合して美しい紫色を呈すること等、ユニークな特徴が多い化合物として知られる。薬用としても抗菌性、血管透過性抑制、肉芽形成促進作用等の古典的な生理活性に加え、近年では血管新生抑制作用、NO 産生抑制、Apoptosis やインシュリン様作用に関する活性等新たな生理活性の報告が相次いでいる。

シコニンに関してはムラサキ培養細胞系による大量生産系が確立されており、既に 1980 年代にはその工業生産がなされている。この培養系によるシコニン生産は、青色光や $NH_4^+$ 等で阻害され、酸性多糖やジャスモン酸で誘導される特徴がある。また毛状根でもシコニン生産ができること、インタクトな根では表皮細胞だけでシコニンが生産・蓄積されることを利用し、de novo RNA-Seq を行って、約 25 万のリード数の中から、シコニン生産時に特異的に発現する遺伝子 124 個を見いだした。その中に、輸送関係遺伝子６個、膜交通系遺伝子６個、酸化還元酵素１０個等、探索していた遺伝子群が見いだされた。さらに京都大学農学研究科植田充美教授との共同研究で、シコニン生産と非生産細胞を用いて定性プロテオーム解析を行った。この際、ゲノム情報が無いことから上記の RNA-Seq の情報をリファレンスとして用いた。その結果、プロテオームのみでシコニン生産に特異的と認められた分子も新たに見いだされ、個別の遺伝子機能解析に進むためのリストを得ることができた。

Lithospermum erythrorhizon, shikonin, omics

発表責任者：矢崎一史（yazaki@rish.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3SY05-1
講演日時、会場：3 月 19 日 14:02～ C22 会場

# ゲノム編集の原理と農芸化学・育種分野への可能性
# Genome editing: principle and application towards biosciences and bioengineering

○村中 俊哉（阪大工）
○Toshiya Muranaka (Osaka Univ.)

細胞の特定の遺伝子配列をターゲットして遺伝子改変を行うことは、ごく一部の生物種に限られていた。そのため、細胞内での遺伝子を改変するには、これまでは自然突然変異や、放射線、変異原処理などによるランダムな変異に期待するか、遺伝子組換え技術により外来遺伝子の発現カセットあるいは遺伝子発現抑制カセットをゲノムのランダムな位置に挿入するしかなかった。それに対し、この数年急速に技術開発が行われている人工ヌクレアーゼ等を用いたゲノム編集技術は、狙った遺伝子のみに変異を高効率に導入できることから、農水産、工業用微生物、医療等、生物が関わるさまざまな研究ならび産業領域への応用展開が期待されている。本シンポジウムでは、ゲノム編集技術の基本原理について概説し、特に、農芸化学ならびに育種分野における研究の現状について私どもの研究プロジェクトを交えて紹介するとともに、今後の可能性について展望する。

本研究の一部は、SIP （戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」（農研機構生物系特定産業技術研究支援センターの支援によって実施された。

参考情報：

日本ゲノム編集学会 HP: http://jsgedit.jp/

次世代農林水産創造技術「新たな育種体系の確立」HP: http://sip-nbt.agbi.tsukuba.ac.jp/

大阪大学大学院工学研究科 生命先端工学専攻 細胞工学領域 HP: http://www.bio.eng.osaka-u.ac.jp/pl/

genome editing, molecular breeding, metabolic engineering

発表責任者：村中俊哉（muranaka@bio.eng.osaka-u.ac.jp）

講演番号：3SY05-2
講演日時、会場：3 月 19 日 14:37～ C22 会場

# 塩基変換による切らないゲノム編集

# Non-cleaving genome editing by base-exchanging reaction

○西田 敬二[1]、荒添 貴之[1]、坂野 聡美[1]、近藤 昭彦[1,2] ([1]神戸大・イノベ、[2]神戸大・工)
○Keiji Nishida[1], Takayuki Arazoe[1], Satomi Banno[1], Akihiko Kondo[1,2] ([1]Dept. Innov. Kobe Univ., [2]Dept. Eng. Kobe Univ.)

あらゆる生物種のゲノム情報を直接操作することが出来るゲノム編集技術は近年著しい進歩を遂げており、生物工学はもちろんのこと生命科学全域においての革命的なツールとなりつつある。代表的な ZFN、TALEN、CRISPR などは人工ヌクレアーゼに類するものであるが、これらの技術はいずれも標的としたいゲノム中の任意の DNA 配列を特異的に認識するようデザインすることが可能であり、標的部位においてヌクレアーゼ活性による DNA 二重鎖切断を引き起こし、その後に宿主細胞が修復する過程で配列の変換が起こり、変異を導入することを期待するものである。これまではジーンターゲッティングが困難であった材料においても非常に有効であることから、動物など高等真核生物を中心に急速に導入が進んでいる。しかしながら切断の修復という過程での不確かな配列の変換や、染色体切断による細胞毒性が問題となり、特に微生物では DNA 修復機構の違いから致死的でそのままの適用が困難な場合もある。
本発表では新たなゲノム編集技術として、ヌクレアーゼ活性と代わる塩基変換反応を採用することによって DNA を切らずに書き換える新たなゲノム編集技術の開発に成功したので紹介したい。CRISPR のシステムからヌクレアーゼ活性を除き、脱アミノ化酵素であるデアミナーゼを付与した Target-AID システムは、標的とする DNA 配列の 3～5 塩基の範囲内にあるシトシンに高効率に点変異を導入することができる。これまでに酵母、大腸菌、動物、植物で有効に機能することを確かめており、基本的にすべての生物に適用できる汎用的な技術であり、従来のヌクレアーゼ型ゲノム編集に付随していた不確実性や毒性の問題を回避することができる。

Cas9, deaminase, Target-AID

発表責任者：西田敬二（keiji_nishida@people.kobe-u.ac.jp）

講演番号：3SY05-3
講演日時、会場：3 月 19 日 15:12～ C22 会場

# ゲノム編集技術に関する特許の最近の話題
# Recent Topics regarding Patents for Genome Editing Technologies

○塚原 優子（平木国際特許事務所）
○Yuko Tsukahara (HIRAKI & ASSOCIATES)

近年開発された CRISPR-Cas システムをはじめとするゲノム編集技術は、ゲノム上の標的部位に高い特異性で且つ簡便に自在に DNA の配列情報を書き換えることができる技術として、基礎研究のみならず、産業界においても多くの関心を集めています。ただ、ゲノム編集技術は、諸外国のベンチャー企業等の多くの企業が特許による権利化を狙っていることから、不用意に使用すると高額な使用料を請求されたり、特許権による権利行使を受ける可能性があります。そのため、予め特許調査を行い、必要に応じて対抗措置を講じる必要があります。また、このように競合の激しい分野では、新たなゲノム編集方法を開発した場合に、積極的に特許権を取得し、自らの実施を確保することも必要になります。

ゲノム編集技術に関連した特許は世界各国で数多く出願されており、中でも、米国の Broad Institute という研究機関が Dr. Feng Zhang による CRISPR-Cas9 の技術を積極的に権利化し、他の企業等にライセンス供与を行っていることが話題になっています。その一方で、早くからこの技術の研究を行っていたカリフォルニア大学バークレー校の Dr. Jennifer A. Doudna を中心としたグループも特許出願を行っています。この出願と Broad Institute の特許との間で、米国でインターフェアレンス（interference）と呼ばれる手続が開始され（2016 年 1 月）、CRISPR-Cas システムに関する同一発明に対する複数の出願者のうち誰が最初に発明したのかについての審査が現在進行中です。インターフェアレンス審査の結果次第で、Broad Institute の既に成立している特許権の一部キャンセルという事態もあり得ることから、インターフェアレンスの審査がどのような結果になるのか世界中から注目されています。

本講演では、ゲノム編集技術に関連した特許の各国での動向の最新情報をお話ししたいと思います。

Genome editing technology, Patent, Intellectual property

発表責任者：塚原　優子（tsukahara-y1004@hiraki-patent.co.jp）

講演番号：3SY05-4
講演日時、会場：3 月 19 日 15:47～ C22 会場

# ゲノム編集など新たな育種技術をめぐる規制動向

# Regulatory Issues related to Genome Editing and other New Breeding Techniques

○立川 雅司 (茨城大農)
○Masashi Tachikawa (Ibaraki Univ.)

ゲノム編集技術は、ライフサイエンスに関わる様々な分野に大きな変化をもたらす画期的な技術として、近年大きな注目を集めている。いわばゲームチェンジャー的な影響をもたらしつつあるともいえる。その影響の大きさが明らかになるにつれ、規制に対する考え方も大きな関心を集めつつある。本報告では、ゲノム編集技術を含む「新たな育種技術」(New Breeding Techniques, NBT) をめぐる規制に関して、最近の海外諸国の動向について報告すると共に、今後の方向性について展望する。

NBT をめぐる規制上の位置づけに関しては、各国の規制の枠組みにおいて判断されることになるため、既存の制度的枠組み（特に GMO 規制）との関連性が重要となる。報告では、米欧をはじめとする主な海外諸国を取り上げ、NBT をめぐる検討状況を概観する。

欧州では、欧州委員会による法的解釈文書の公表が遅れる中、規制のあり方をめぐって徐々に対立が生じつつある。特に、2016 年 10 月にフランス国務院が欧州司法裁判所に対して、突然変異誘発技術により得られた生物の規制上の位置づけに関して法的解釈を求めた。欧州司法裁判所の判断は、今後の欧州における基本政策を左右するものとして注目に値する。

米国では、ケースバイケースで判断がなされるなか、大統領府を中心として、既存のバイテク政策の基本的枠組みを見直す機運がある。科学技術振興と行政府の負担軽減を両立させつつ、既存の政策をどのようにアップデートするか模索されている。

米欧以外の国として、ニュージーランドとアルゼンチンも注目に値する。アルゼンチンは、NBT 由来の作物に関する事前相談手続きを 2015 年 5 月に導入し、簡便な審査での上市を認めた。他方、ニュージーランドについては、1998 年 7 月以降に導入された、DNA や染色体に変異をもたらす技術は、すべて規制対象とする規則改訂を行った。両国がこのように対照的な制度を導入したことで、規制の国際的調和は困難となった。こうした状況が拡大することは、農産物貿易などに混乱をもたらしかない。

今後も、これまでの規制の枠内だけでは想定できない技術が登場し、様々な分野に応用されていくと考えられる。これらをどのように管理すべきかが改めて問われている。安全性評価、安全性管理、表示・情報提供、技術開発、知的財産権、国際的整合化など多角的な視点を考慮しつつ、新技術をめぐるガバナンスのあり方を模索していくことが課題となろう。

Genome Editing, Regulation

発表責任者：立川雅司（masashi.tachikawa.3@vc.ibaraki.ac.jp）

講演番号：3SY05-5
講演日時、会場：3 月 19 日 16:22～ C22 会場

# CRISPR-Cas Enabled Plant Breedging

○Mieko KASAI (DuPont Production Agriscience K.K.)

Development of new plant varieties is aimed to increase agronomic productivity and contribute to addressing global challenges associated with food security, population growth, and climate change. Classical plant breeding has been historically relying on plant's genetic variation to develop new traits. Favorable allelic variation, spontaneous mutations, and random mutations induced by classical (chemical or irradiation) mutagenesis have been a source of genetic diversity carried forward by plant breeders into the commercially valuable varieties. The ability to induce genetic variation in a targeted and thus efficient fashion has been viewed as a much needed breakthrough and a challenge until recently. CRISPR-Cas gene editing technology presents such breakthrough as it enables targeted modification of plant's endogenous genes of interest without introducing the genetic material foreign to that species.

Several applications of CRISPR-Cas gene editing technology will be described, including the first DuPont Pioneer CRISPR-Cas commercial trait in development, Next Generation Waxy Maize. It is important to consider that many technology applications produce plants that are indistinguishable from those that could be developed from spontaneous or induced mutagenesis or by bringing the desired allele from another variety through a series of breeding crosses – i.e., conventional plant breeding tools.

CRISPR-Cas gene editing is a significant advancement in precision plant breeding due to the technology versatility, efficiency, and ability to work across plant species. DuPont Pioneer is committed to utilize CRISPR-Cas gene editing as one of the approaches to develop new and improved agricultural products. A full potential of CRISPR-Cas enabled plant breeding has to be explored by the entire global scientific community. DuPont Pioneer has a long history of collaborations and welcomes the opportunities to collaborate with others to facilitate the deployment of CRISPR-Cas advanced breeding for developing accessible and sustainable agricultural solutions.

CRISPR-Cas, plant breeding, waxy corn

発表責任者：笠井　美恵子（mieko.kasai@dupont.com）

講演番号：4SY01-1
講演日時、会場：3 月 20 日 09:00～ C16 会場

# バイオミメティクスと生体由来反磁性微小結晶の磁気マニピュレーション法

# Biomimetics and magnetic manipulation of diamagnetic micro-crystals derived from organisms

○水川 友里[1,2] ([1]広島大学大学院　先端物質科学研究科、[2]日本学術振興会)
○Yuri Mizukawa[1,2] ([1]Hiroshima Univ., [2]JSPS)

魚類，昆虫，爬虫類，植物など，様々な生物の持つ特異な光学特性に魅了された研究者は 90 年前から既に存在し(C. W. Mason, *J. Phys. Chem.*, **31**, 321(1927).)，現在も多くの研究者がその光学特性を調査し続けている．近年では，生物学における学術的基礎研究という側面のみならず，バイオミメティクスという生物機能の有用性から新たな技術知見を発見し，既存技術に応用することでさらなる技術発展・新たな学術知見発見に貢献する研究が増加している．このように多分野からの研究アプローチが増加したことで，さらに生物機能に対する研究は進展し続けている．

本発表では，バイオミネラリゼーションで形成される反磁性微小結晶に対し，光反射の磁気制御によって織りなされる“美と有用性，機能性”について焦点を当てる．

魚類，特に深海魚には，眼球および体表面の色素胞細胞において“グアニン結晶”と呼ばれる，核酸塩基のグアニンから成る単結晶が周期的に配列している．この周期的配列のために，強い光反射を生じ，銀色や虹色などの美しい構造色を呈する．魚類は微小結晶によるこのような周期的構造を利用して，外敵から身を守るための光学迷彩として，またはパラボラ型に配列させることで，眼球内において効率的に集光させるミラーとして利用している(M. Kreysing, *et al.*, *Science*, **336**, 1700(2012).)．また，このグアニン結晶は色素胞細胞から単離した状態でも強い光反射と構造色を示す傾向にあることが判明した．そこで我々の研究では，この単離したグアニン結晶に対し，磁力線と観察方向，光の入射方向を制御することで，光反射の増強・抑制を自在に制御する手法を編み出した(M. Iwasaka and Y. Mizukawa, *Langmuir*, **29**, 4328(2013).)．また藻類の一種である円石藻は，湾曲した円盤が 2 枚重なるという複雑な構造を有した炭酸カルシウムの単結晶体である．この円石に対して磁場を印加すると，円盤面が磁力線に対して垂直に配向することが明らかとなった．このことから，円石の光反射を磁力線によって制御することで，円石の新たな生物機能を明らかにするための実験的アプローチを開拓できた(Y. Mizukawa, *et al.*, *Sci. Rep.*, **5**, 13577(2015))．

このように，反磁性結晶から成る生物機能を，磁気という物理的アプローチによって自在に制御できることは，生物の“機能美”を人工的にコントロールすることができることを示している．さらにこの制御法によって，生物機能の真の役割および生物機能の模倣手段や技術を追及することが可能であることを明らかとした．これより，微小結晶の磁気制御法には，バイオミメティクスとしての技術発展や学術的知見への貢献に繋がるさまざまな可能性を大いに秘めていると考えられる．

Biomimetics, Guanine crystal, Magnetic manipulation

発表責任者：水川　友里（y-mizukawa@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：4SY01-2
講演日時、会場：3 月 20 日 09:25～ C16 会場

# 真正粘菌に学ぶ生物の適応ネットワーク理論

# Adaptive Network Theorem with True Slime Mold

○手老 篤史 (九州大学)
○Atsushi Tero (Kyushu Univ.)

生物は個体・集団にかかわらず輸送ネットワークを形成する。例えば集団の例では、人間は鉄道網などの交通網を形成するし、蟻は餌を巣に運ぶために化学物質を用いて餌と巣の間に行列を形成する。また、人間の内部には血管網が存在し、輸送ネットワークを形成している。これらのネットワークはどれも利用されている部位がより太く成長するという適応的な性質をもっている。

本研究では真正粘菌変形体（以下、粘菌）の輸送ネットワークに着目する。粘菌は個体と集団両方の性質をもつ多核単細胞生物である。この生物が迷路を解いたり、都市ネットワークと同等のネットワークを形成したりすることが報告されている。

ここでは粘菌のネットワークの数理モデルを用いて、様々な生物ネットワークに適応可能な理論を解説する。また、これまでの適応ネットワーク理論は輸送の流入点と流出点を結ぶ短い経路上でネットワーク形成が成されていたが、血管網では酸素供給の観点から迂回路に輸送網を形成する必要がある。ここでは血管の成長則の変化により迂回路を自発的に選択する数理モデルについても発表したい。

Mathematical Model, Adaptive Network, True Slime Mold

発表責任者：手老　篤史（tero@imi.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：4SY01-3
講演日時、会場：3 月 20 日 09:50～ C16 会場

# 円石藻：二億年天然微細石灰彫刻

# Coccolithophore: the natural calcified microsculpture over two hundred million years

○遠藤 博寿（筑波大学）
○Hirotoshi Endo (Univ. Tsukuba)

現在の海洋は、珪藻、渦鞭毛藻、円石藻という 3 種類の微細藻類により優占されている。これらの単細胞藻類の細胞は、独特な形態をもつ外骨格で覆われている。外骨格の主成分は、シリカ（珪藻）、多糖（渦鞭毛藻）、炭酸カルシウム（円石藻）とそれぞれ異なるが、いずれも非常に美しい造形をもつ。中でも、円石藻がその細胞表面にディスプレイする微結晶には、「ココリス」(coccolith; cocco=円、lith=石)という名称がつけられており、人工的に作り出すことは不可能なほど微小で複雑な形状を有している。また、このココリスはカルシウムイオン($Ca^{2+}$)と重炭酸イオン($HCO_3^-$)から形成されるため、円石藻は、光合成のみならずココリス形成のための第二の炭酸固定能をも有している。

円石藻は、分類学的にはハプト植物門に属する海洋性の二次共生藻類であり、中生代の初期に出現し、ジュラ紀から白亜紀にかけてその多様性とバイオマスが最高潮に達したと考えられている。地球環境学的な観点からみると、円石藻の出現がもたらした最も大きな環境変化は、外洋における炭酸カルシウムの蓄積であるといえる。つまり、外洋に生息域を拡大した円石藻が浅海域の $CO_2$ を固定し、深海へ沈降することにより、現在においても地球の炭素循環に影響およぼす巨大な生物ポンプが形成されたことが地質学的に検証されている。一方で、円石藻は DMSP（dimethylsulfoniopropionate、ジメチルスルフォニオプロピオネート）という大気中で雲を形成する核となる DMS（硫化ジメチル）の前駆体を大量に形成することにより、地球規模での硫黄循環にも貢献している。また、円石藻には大量の脂質を細胞内に蓄積する種(*Pleurochrysis caterae* など)や、アルケノン(alkenone)という特殊な長鎖不飽和脂肪酸を生産する種(*Emiliania huxleyi* など)がおり、近年ではバイオエネルギー研究の観点からも注目されている。

円石藻のココリス形成は、まず、ゴルジ体由来の小胞内で、主にセルロースでできた基板が作成されることから開始される。小胞内で形成された基板上では徐々に炭酸カルシウム結晶の沈着が進み、完成したココリスはエクソサイトシスにより細胞外へ放出され、細胞表面上に並べられる。このように、ココリス形成のすべてのステップは細胞内で完了されることから、この機構は完全に遺伝的に制御されていると予測されるが、その詳細は未だに未解明の部分が多く残されている。近年、我々の研究グループは円石藻における形質転換技術を確立し、現在はその技術を駆使して円石藻の種々の生理機構の解明を試みている。本発表では、海外の研究グループの動向も含め、ココリス研究に関する最新の知見を紹介し、2 億年続く天然微細石灰彫刻ともいうべきココリスの魅力について語る。

coccolithophore, calcification, genetic transformation

発表責任者：遠藤博寿（endo.hirotoshi.fu@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：4SY01-4
講演日時、会場：3 月 20 日 10:15～ C16 会場

# 生体分子磁気応答の高感度検出に関わる一手法

# A method for efficient detection for magnetic responses of biological molecules

○岩坂 正和 [1,2] ([1] 広大 RNBS、[2]JST CREST)
○Masakazu Iwasaka[1,2] ([1]Hioshima Univ., [2]JST CREST)

DNA やタンパク質などの生体分子を制御する手法として、その構造形成を制御する化学的なアプローチの他、その「動き」によるかたちづくりのプロセスを制御する方法として、光、電場そして磁場といった「物理場」を用いるアプローチが考えられる。この 3 つの物理的手法の中で磁場は遠隔計測制御に優れているといえる。これまでの研究の多くは電子スピンの常磁性を生体分子の磁気応答計測に利用している。鳥の磁気感覚のメカニズムであるラジカルペアを経由する酵素反応にたいする磁場効果研究も進んでいる。一方、電子をもつ全ての原子・分子が、外部磁場下で誘導する「反磁性」は、数テスラ以上の磁場下で健在化するため、その反磁性を介した磁気応答（磁場配向）は無視できなくなる。例えば、マイクロチューブルスは重合過程でテスラ級（Tesla＝1 万ガウス、地磁気は 30～40 マイクロテスラ）の磁場でその配向を制御できる。このことは、細胞組織工学における細胞集団構造形成制御や、受精卵の非接触な分割制御などに応用可能である。10 テスラを超える超強磁場であれば、ミオシンタンパクの回転制御も可能であろう。”cell chirality”の磁場制御が今後の研究展開として期待される。また、生体分子が秩序化した凝集体（結晶など）を形成した場合、その反磁性エネルギーが積分されるため、比較的低磁場（永久磁石程度）でも磁気応答が顕著となる。さらに、光計測法を組み合わせることでこの磁場配向の検出感度は増強する。魚類のグアニン結晶の光反射の磁気応答は非常に顕著である。太陽光を利用してきた生物の体表の生体組織（色素胞など）に含まれる結晶性の微小物体は、周期的構造をもつフォトニック結晶（マテリアル）として高い光制御機能を持つ。今後、このグアニン結晶などが有用な光学デバイスに活用されることが期待される。

biological molecules, magnetic field, magnetic orientation

発表責任者：岩坂正和（iwasaka@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：4SY01-5
講演日時、会場：3 月 20 日 10:40～ C16 会場

# 細菌におけるエイコサペンタエン酸の生理機能

# Physiological function of eicosapentaenoic acid in bacteria

○栗原 達夫、川本 純、渡辺 文太、小川 拓哉（京大化研）
○Tatsuo Kurihara, Jun Kawamoto, Bunta Watanabe, Takuya Ogawa (Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.)

ω3 系高度不飽和脂肪酸の一種であるエイコサペンタエン酸 (EPA) は、リン脂質のアシル鎖として生体膜の物性に影響を及ぼすほか、動物においては種々の脂質メディエーター前駆体として機能することが知られている。特にヒトにおいて動脈硬化や高脂血症などの血管系疾患の予防効果をもつことから、機能性脂肪酸として注目を集めている。一方、EPA は海洋性低温菌の多くが、リン脂質のアシル鎖成分として生産することも知られている。我々は、EPA の細菌における機能を解析し、これが低温における細胞分裂や膜タンパク質の生合成において重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。さらに解析を進めた結果、低温菌の一種である *Shewanella livingstonensis* Ac10 において、EPA 欠損が膜小胞の分泌生産を促進することも示された。EPA は膜リン脂質のアシル鎖として存在することから、EPA をリン脂質に導入する酵素を探索した。その結果、1-アシル-*sn*-グリセロール-3-リン酸 *O*-アシルトランスフェラーゼ PlsC1 がその機能を担うことが示された。精製 PlsC1 を用いた解析の結果、本酵素が不飽和脂肪酸の CoA エステルに高い特異性をもつことも示された。一方、EPA 含有リン脂質の細胞内局在性を明らかにするため、EPA 含有リン脂質の蛍光標識アナログを合成し、本菌に添加したところ、細胞分裂中の細胞の核様体閉鎖領域への局在が観察され、細胞分裂部位の膜において EPA 含有リン脂質が機能していることが示唆された。しかし、本蛍光標識アナログは天然型 EPA 含有リン脂質の生理機能を完全には代替できなかったことから、EPA 本来の機能を解析する上で改良の余地があると考えられた。そこで、EPA との構造上の差異を最小限にとどめた EPA アナログとして、EPA のω末端にエチニル基（炭素-炭素三重結合をもつ官能基）を導入した化合物 (cEPA) を合成した。エチニル基はアジド基とクリックケミストリーの手法で特異的に結合させることができるため、cEPA そのものや、cEPA を含む生体分子（cEPA 含有リン脂質など）をアジド基含有蛍光試薬によって特異的に検出したり、アジドビオチンなどと結合させてアフィニティー精製することなどが可能になると期待された。cEPA を *S. livingstonensis* A10 の EPA 欠損株に添加したところ、EPA 欠損による生育遅延が抑制されたことから、cEPA は EPA の生理機能を代替できるものと考えられた。cEPA はリン脂質のアシル鎖として取り込まれたほか、タンパク質へも取り込まれることが見いだされた。cEPA によって修飾されたタンパク質の一つは、ジペプチジルカルボキシペプチダーゼと同定された。これらのリン脂質やタンパク質の局在性や機能の解析を進めることで、EPA の機能発現のより詳細な仕組みを明らかにできるものと考えられた。

eicosapentaenoic acid, phospholipid, biological membrane

発表責任者：栗原達夫（kurihara@mbc.kuicr.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4SY01-6
講演日時、会場：3 月 20 日 11:05～ C16 会場

# セレン含有型ヒドロゲナーゼの美しき分子進化

# [NiFeSe] Hydrogenase Elegantly Evolved as Molecular Edifice

○田村 隆 (岡山大院・環境生命)
○Takashi Tamura (Okayama Univ.)

呼吸とは，栄養分から掻き集めた還元当量を呼吸鎖に流して ATP を産生しながら，最終的に電子を酸素に捨てるプロセスと言える。硫酸呼吸は，酸素の代わりに硫酸に電子を捨てる極めて古い様式の呼吸であり，35 億年前の地層にもその痕跡が残されている。*Desulfovibrio* 属などの硫酸還元菌 (Sulfate Reducing Bacteria/SRB)の多くはペリプラズム空間に酵素ヒドロゲナーゼ(Hase)を持っている。Hase は水素とプロトンの相互変換を触媒する酸化還元酵素であり硫酸呼吸系を構成している。

一般的に Hase は酸素感受性が高く，人類社会がこの酵素を水素変換触媒として利用する上でも，酸素耐性の向上が重要課題になる。*D. vulgaris* が持つ[NiFeSe]Hase は，活性中心にセレノシステイン(Sec)残基を持つユニークなセレン含有酵素であり，Sec 残基が持つ高い還元力のために高い酸素耐性を示す。Sec 残基は，オパールコドン(UGA)によって指定される 21 番目のアミノ酸であり，特殊な翻訳装置によってポリペプチド鎖に取り込まれる。データベース上で微生物ゲノム情報を検索すると 12 種類もの[NiFeSe]Hase 遺伝子を持つ SRB 株が存在している。これらの株は，系統的には近縁株でありながら，その分離源は地球の半周分もの距離に離れている。そこで，分離地点を２億年前の地球地図に当ててみると，パンゲア大陸に局在する３系統グループに収束することが示された。これらの SRB が地球上に普遍的に拡散した過程において生息ニッチが大陸とともに移動したことが示唆される。今日，[NiFeSe]Hase 遺伝子を持つ SRB のある株は土壌，油田に棲息し，また別の株はヒトの腸内細菌として，また海生の株としては，嫌気性の高い熱水噴出口周辺に棲息するものや，日中は陽光が差し込む浅い海洋堆積層(微好気環境)に棲息するものに大別される。

[NiFeSe]Hase は，細胞外ペリプラズム空間に局在するので，嫌気または微好気な環境に曝されており，酵素はそれぞれの環境に適応した分子進化を遂げてきたと考えられる。そこで[NiFeSe]Hase の分子進化を立体構造として復元して，酵素が環境に適応した分子メカニズムを考察した。最初に Sec 残基を獲得した共通祖先から現存の株の酵素にまで至る進化の系統樹を辿りながら，中間的祖先タンパク質についてもその一次構造(塩基配列)を算出した。つぎに，X 線結晶構造解析によって明らかにされている *D. vulgaris* の[NiFeSe]Hase の結晶構造(2wpn.pdb)を鋳型として，ホモロジーモデリングと分子動力学計算を組み合わせた重厚な計算化学によって，酵素の分子進化を立体構造の変遷として再現した。Sec 残基を最初に獲得した共通祖先酵素から陸生，海生の Hase へと分化した過程で，絶対的な嫌気条件が保障された棲息ニッチでは[NiFeSe]Hase は巨大なガスキャビティを徐々に開口させたことが示された。対照的に微好気な環境に棲息した株では，共通祖先酵素によく似た閉塞した立体構造が得られた。このような立体構造の変遷を駆動するメカニズムとして，アミノ酸残基の非同義置換が特定のコドン(全体の 5%)に蓄積していた。タンパク質の分子進化は，アミノ酸配列の変遷を眺めるだけではなく，それらの立体構造を復元することによって，その本質を考察することができる。

[NiFeSe] Hydrogenase, Selenocysteine, Molecular Dynamics

発表責任者：田村　隆（tktamura@okayama-u.ac.jp）

講演番号：4SY01-7
講演日時、会場：3 月 20 日 11:30～ C16 会場

# タンパク質の美しき電子の世界
# The beautiful electronic world of proteins

○佐藤 文俊、平野 敏行（東大生研）
○Fumitoshi SATO, Toshiyuki HIRANO (IIS, Univ. of Tokyo)

タンパク質研究の世界では、ウェット系の加工技術はほぼ完成、計測技術も進んでいるが、ドライ系の制御・予測の技術が遅れている。ドライ技術がウェット技術と両輪をなす手段となるためには、2 つのドライ技術のさらなる展開が必要となろう。1 つはシステムバイオロジーの強化であり、もう 1 つは電子構造の本格的な活用である。発表者らは後者の研究を推進している。

タンパク質の分子構造に基づく研究では、X 線や NMR 解析により立体構造を詳細に観測し、これらスナップショットから古典分子動力学計算を用いて構造変化を追跡する一連のスタイルが定着した。しかし、これでは酵素反応に代表される化学反応の主役である電子が不在である。そのアンサーとして、QM/MM 法などの反応中心周りを量子化学（QM）で、その他を古典分子力場（MM）で計算する研究が盛んに行われるようになった。これらの成果から QM/MM 法は 2013 年のノーベル化学賞を受賞するに至ったが、限界もはっきりしてきた。いや、限界は当初からわかっており、興味の対象が QM/MM 近似の守備範囲外へと移行しつつある、というのが正解かもしれない。

反応中心周りで重要なアミノ酸残基を見出すことからは、意外な発見にはなかなか至らない。立体構造やホモロジーを見れば、ある程度目星がついてしまうからである。目星が付くから QM 領域を定義できるともいえる。実験では、反応中心から離れた場所の改変で性能が変化するとか、性能が向上する変異体が 2 種あり、これらを同時に改変した変異体では性能が逆に低下するといった現象をよく経験する。これらの解析には QM/MM 法は適用外である。しかも、このような要因こそ反応中心の環境を変えずにタンパク質の性能をコントロールするカギとなるかもしれない。ランダムミューテーションのような偶然に頼らずにこれらを発見できるならば、タンパク質の新しい設計法に寄与するだろう。

分子はその反応の前後・間の過程で、分子全体にわたって電子密度分布が再編成されるが、タンパク質でも同様である。反応中心周りの分子軌道と近いエネルギーの分子軌道を持つアミノ酸残基も、反応に影響を与える可能性が高い。これらが活性中心近傍のみならず離れたアミノ酸変異が反応機構に関与する主な原因と考えられる。解析には、計算モデルや計算解法に近似を用いない正準分子軌道法（CMO 法）が必要となる。発表者らは、タンパク質のような大規模な CMO 計算に不可欠となるスパコンの性能を引き出すアルゴリズムの研究開発と、これを用いたタンパク質の電子構造に基づく基礎・応用研究を行っている。本講演では、研究の現状や将来性を議論するとともに、タンパク質 CMO 計算の結果が示す美しい電子の世界を紹介したい。

protein, quantum chemistry, canonical molecular orbital method

発表責任者：佐藤 文俊（satofumi@iis.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4SY02-1
講演日時、会場：3 月 20 日 09:00～ C21 会場

植物感染性線虫の誘引物質の探索
Attractant of Plant Parasitic Nematodes
大田 守浩、ツァイ アレン、鈴木 れいら、島岡 知恵、石田 喬志、○澤 進一郎（熊大理）
Morihiro Oota, Tsai Allen, Reira Suzuki, Chie Shimaoka, Takashi Ishida, ○Shinichiro Sawa (Kumamoto Univ.)

根粒菌などのバクテリアやカビ等の単細胞微生物と、植物との生物間相互作用に関する分子メカニズムは、これまでに、植物病理学という文脈の中で研究が発展し、様々な知見が得られている。一方、多細胞動物-多細胞植物相互作用に関する分子遺伝学的研究は、研究に適した実験系が確立されていないこともあり、ほとんど行われていない。さらに、生物間相互作用時には、虫こぶの形成や毒素の生産開始等、植物は、特殊な形態変化や生理応答を引き起こす場合がある。このことから、生物間相互作用の研究は、生物間コミュニケーションの分子機構の解析のみならず、これまで未知であった植物の新しい遺伝子機能の解析も期待できる。次世代シーケンサーなどにより、モデル生物が固定されなくなってきた今こそが、様々な実験系を用いた多細胞動物-多細胞植物相互作用に関する研究が進展できる好機であると考えられる。

一方、植物感染性線虫は、農業的に大きな被害を与えるために、これまでに、農学的研究が精力的に行われてきたが、線虫感染過程におけるメカニズムについて、その基礎研究はあまり進んでいない。

そのような研究環境の中、我々は、植物感染性線虫であるサツマイモネコブセンチュウの液体培養系を構築し、既存の方法では 1 日に数十～数百頭単離できるのがやっとであった滅菌線虫を、1 日に 100 万頭得ることを可能とした（Nishiyama et al., 2015）。このことにより、分子遺伝学的解析から線虫感染抵抗性試験まで、幅広い研究に、滅菌線虫を資することが出来るようになった。また、線虫の行動を評価出来るマイクロデバイスを開発し、線虫の誘引・忌避物質を数値で評価出来るようになった（Hida et al., 2015）。これらの研究基盤整備の結果、我々は、現在、植物が分泌していると考えられている植物感染性線虫誘引物質の探索を開始した。

植物感染性線虫誘引物質の探索としては、大きく二種類にわけられる。まずひとつ目は、大豆などの作物の抽出物からの誘引物質の精製である。この精製の現状について、本発表中にて紹介したい。また、もう一つのアプローチとしてはケミカルライブラリースクリーニングである。これまでに、いくつかの誘引・忌避物質を同定しているので、その化合物の紹介を行う。

さらに、誘引・忌避物質は、農業分野にて線虫ホイホイ（線虫トラップ）などの開発にも繋がると考えられる。実際、誘引物質の候補を用いた場合、実験室内では線虫トラップとして機能する事も明らかとなってきた。本発表では、以上のような、誘引物質の研究の最前線と、応用研究に向けた基盤整備について紹介し、是非とも議論を深めさせていただきたいと考えている。

Plant parasitic nematode, attractant, plant

発表責任者：澤　進一郎（sawa@sci.kumamoto-u.ac.jp）

講演番号：4SY02-2
講演日時、会場：3 月 20 日 09:30～ C21 会場

# 植物免疫活性化剤「プラントアクティベーター」の可能性と課題

# Plant activators: Opportunities and future challenges from viewpoint of agrochemical industry

○山下 真生（日本農薬（株）総合研）
○Masao YAMASHITA (Nihon Nohyaku Co.,Ltd.)

農薬は病害虫雑草のみならず作物の生理を人為的に調整、制御することで安定的な農業生産に貢献し続けている。プラントアクティベーターは作物が本来有する植物免疫機構を活性化し、病原菌の感染を阻害することで間接的に病害防除を実現するという農薬の中では特異なカテゴリーに属する。本講演では、特に我が国で産業的な成功を収めたプラントアクティベーターの歴史と現状を紹介し、産業面から見た魅力、可能性と課題について紹介したい。

plant activator, plant immunity, disease control

発表責任者：山下真生（yamashita-masao@nichino.co.jp）

講演番号：4SY02-3
講演日時、会場：3 月 20 日 10:00～ C21 会場

# イネ科植物における二次代謝多様性の進化

# Evolution of diverse secondary metabolism in the Poaceae

○石原 亨（鳥取大農）
○Atsushi Ishihara (Tottori Univ.)

植物は、病原菌や植食性の動物との相互作用を原動力に多様な二次代謝生合成経路を獲得してきた。しかし、実際に二次代謝がどのように進化したのかについての情報はあまりない。私たちは、イネ科植物を対象に、科、属、種のそれぞれのレベルで二次代謝の進化についての研究を行っている。二次代謝多様性の作物保護における利用についての展望も交えて最近の研究成果を紹介したい。

１．イネ科植物での生体防御に関連する二次代謝の進化

イネ科植物は、BOP クレードと PACMAD クレードに大きく分けられる。64 種のイネ科植物を用いてイネ科の代表的な防御物質、ベンゾキサジノン類とグラミンの蓄積を調べた。これらの化合物は、BOP クレードと PACMAD クレードの両方にまたがって存在していたが、蓄積する種は特定の亜科に偏っていた。したがって、イネ科の祖先種が持っていた生合成経路を多くの種が失ったと考えられた。

２．オオムギ属における二次代謝の進化

オオムギ属は 31 種からなり、４つのクレード H、Xu、Xa、および I に分類される。このうち、H と Xu クレード、I と Xa クレードがそれぞれ近縁で、栽培オオムギは H クレードに属する。栽培オオムギは、特有の抗菌性物質であるヒドロキシ桂皮酸アミド二量体を蓄積する。オオムギ属での防御関連二次代謝の進化を明らかにするため、様々なオオムギ属植物が蓄積する防御物質を調べた。その結果、H および Xu クレードが、I および Xa クレードから分岐する段階で、ベンゾキサジノン類による防御機構からヒドロキシ桂皮酸アミド二量体による防御機構へのシフトが生じたことが分かった。

３．イネのファイトアレキシン蓄積の多様性

ワールドライスコアコレクションを利用して、ファイトアレキシンであるサクラネチンの蓄積を調べた。イネの品種の中にはサクラネチンを蓄積せず、その前駆物質のナリンゲニンを蓄積する系統が存在していた。また、ナリンゲニンを蓄積する系統は、東アジアには存在せず、南アジアを中心に分布していた。ナリンゲニンは、サクラネチンと比べ細菌に対して強い毒性を示す。熱帯地域で被害が深刻な細菌病に対応するために、ナリンゲニンを蓄積する性質が選抜された可能性が推定された。

以上の研究から、イネ科植物において二次代謝が多様化する過程がおぼろげながら浮かび上がってきた。また、化合物ごとに生物活性（抗菌活性）が大きく異なっていることや、一つの種内においてさえ、大きな二次代謝多様性が存在することも分かった。現在の農業では、多様性はむしろ排除される傾向が強い。これを回復することで持続可能な農業を実現する可能性についても議論したい。

secondary metabolism, diversity, Poaceae

発表責任者：石原　亨（aishihara@muses.tottori-u.ac.jp）

講演番号：4SY02-4
講演日時、会場：3 月 20 日 10:30～ C21 会場

# 植物の生長を促進する葉面微生物の植物共生メカニズム

# Physiology of symbiosis in phyllosphere microbes promoting plant growth

○阪井 康能、由里本 博也（京大農　応用生命）
○Yasuyoshi SAKAI, Hiroya YURIMOTO (Appl. Life Sci., Kyoto Univ.)

近年、微生物の棲息場所としての植物地上部（葉圏、phyllosphere）が注目されるようになってきた。葉圏微生物と植物との相互作用については、根圏微生物や植物病原菌に関する研究に比べて研究の歴史が浅かったが、次世代シーケンサなどの解析技術の進歩により、葉圏微生物叢の解析や植物生長促進効果を示す微生物に関する研究が盛んになってきている。地球上の葉の表面積は、地球の表面積の２倍に匹敵する $10^9$ km$^2$ という試算があり、その表層には膨大な数（$10^{26}$ 以上）の微生物が棲息していると言われている。根粒菌などの根圏微生物だけでなく、植物の生長制御には植物と相互作用する葉面微生物も大きな影響を及ぼす。特に植物から年間１億トン放出されるメタノールを炭素源として増殖する *Methylobacterium* 属細菌は、葉面の優占微生物種として棲息し、植物から放出されるメタノールを主要な炭素源として利用し、植物ホルモンの生産や、金属塩やリン酸などの栄養源の吸収を促進する物質の生産によって植物生長促進効果をもたらす相利共生菌であることが知られている。この生長促進や共生のメカニズムの解明は、新しい農作物増産技術の開発および自然界における植物－微生物相互作用のさらなる理解につながると期待される。

我々は *Methylobacterium* sp. OR01 株がアカシソの葉と種子に優占的に棲息することを見出し、さらにアカシソと OR01 株が栽培環境によらず強い共生関係にあり、*Methylobacterium* 属細菌と植物の間に種レベルでの特異性があることを報告した[1,2]。本講演では、植物上での *Methylobacterium* 属細菌の分布や種子から葉への定着過程を蛍光標識した OR01 株を用いて追跡した結果や、葉面およびメタノールを炭素源とする条件での培養時に OR01 株が示す増殖能力の高さを示す結果について紹介する。一方、光・温度・日周性などの環境要因の他、植物光合成代謝や植物免疫に起因する様々なストレスを受ける葉面環境に、*Methylobacterium* 属細菌を含む葉面微生物が適応するための機構に関する最新の知見もあわせて紹介する。

1) Mizuno et al., Biosci Biotechnol Biochem, 77, 1533-1538, 2013.
2) Mizuno et al., Biosci Biotechnol Biochem, 76, 578-580, 2012.

Methylobacterium, symbiosis, methylotroph

発表責任者：阪井康能（ysakai@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4SY02-5
講演日時、会場：3 月 20 日 11:00～ C21 会場

# RNA を介した生物間相互作用を用いた新奇害虫防除法の開発

# Development of new pesticide based on the interaction between plants and insects through RNA

○佐藤 豊[1]、吉岡 博文[2]、新美 輝幸[3] ([1]遺伝研、[2]名大農、[3]基生研)
○Yutaka SATO[1], Hirofumi YOSHIOKA[2], Teruyuki NIIMI[3] ([1]Natl. Inst. Genetics, [2]Nagoya Univ., [3]Natl. Inst. Basic Biol.)

生物間の相互作用は、ダイナミックな進化プロセスを観察することができる現象であると考えられる。実際、宿主とそこに寄生する寄生者や病原菌の間に見られる防御と対宿主戦略の進化は、しばしば arms-race（軍拡競争）に例えられ、両者の相対的関係が維持されているように見えるのは、留まる事のない両者の進化の結果である。これまでにも宿主と寄生者など様々な生物間の相互作用とそれを媒介する分子は明らかにされているが、RNA が直接の情報分子となり生物界をまたいで遺伝子発現に影響を与える事例はほとんど知られていない。

私達の研究グループでは、ジャガイモの害虫であるニジュウヤホシテントウの餌に二重鎖 RNA (dsRNA)を混ぜておくと、エサから取り込まれた RNA がニジュウヤホシテントウの遺伝子発現を制御する現象を発見した。昆虫が摂食により取り込んだ dsRNA による昆虫の遺伝子発現制御の生物学的な意味を考えてみると、ニジュウヤホシテントウはジャガイモが持つ内在性 dsRNA をエサとして日々食べており、植物が持つ内在性の dsRNA（ほとんどは機能未知）が、実は、昆虫などの遺伝子発現を調節しているのではないかと考えられる。本発表ではこのアイデアを基にして現在開発中の二重鎖 RNA を用いた農薬（RNA 農薬）に関して現状を報告する。また、植物に内在する小分子 RNA やその前駆体である dsRNA のそれを摂食する昆虫との間での伝搬と制御機構、ならびに両者の進化や生態における RNA を介した種を超えた遺伝子発現調節の意義を考察する。

Plant, Insect, RNA

講演番号：4SY02-6
講演日時、会場：3 月 20 日 11:30～ C21 会場

# 根寄生雑草に特徴的な代謝経路の同定と選択的除草剤への展開

# Identification of characteristic metabolic pathways in root parasitic weeds toward development of their selective herbicides.

○岡澤 敦司（阪府大生環）
○Atsushi Okazawa (Osaka Pref. Univ.)

ハマウツボ科（Orobanchaceae）の根寄生雑草は，アフリカなどの乾燥地農業に大きな被害をもたらしている．その根本的な解決法は未だ確立されておらず，近年の気候変動に伴う地球規模での分布域および被害の拡大が懸念されている．一方，根寄生雑草は完全に宿主に依存した生活環を有しており，植物進化の観点からも興味深い生物である．我々は，根寄生雑草が特殊に進化した植物であることから，宿主にはない，あるいは，宿主中ではさほど重要でない代謝経路中に，宿主の生存にとって極めて重要な代謝経路が存在するのではないかと予想した．この予想が正しければ，その代謝経路の阻害剤は根寄生雑草特異的な除草剤となる可能性がある．そこで，国内で入手可能な根寄生雑草であるヤセウツボ（*Orobanche minor*）を実験材料として，その発芽過程についてメタボローム解析を行った．なお，根寄生雑草は宿主への寄生を確実に行うため，宿主の根から分泌されるストリゴラクトンなどの発芽刺激物質をシグナルとして発芽することが広く知られており，このストリゴラクトン依存的な発芽もハマウツボ科根寄生雑草の特殊な生活環の一過程である．メタボローム解析の結果，ヤセウツボは乾燥種子中にプランテオースという三糖を貯蔵物質として蓄積していることが明らかとなった．プランテオースはヤセウツボだけではなく，*Striga hermonthica* など他のハマウツボ科根寄生雑草の乾燥種子中にも蓄えられていた．さらに，ノジリマイシンやデオキシノジリマイシン，カスタノスペルミンといった糖質加水分解酵素阻害剤がこれら根寄生雑草の発芽に及ぼす影響を調べたところ，特にノジリマイシンがその発芽あるいは幼根の身長を著しく阻害することを見出した．幸運なことに，その効果は根寄生雑草特異的であり，宿主や他の植物に対するノジリマイシンの生理活性は著しく低いということが明らかとなった．詳細な分析の結果，ノジリマイシンはプランテオース代謝の二段階目であるインベルターゼが触媒するスクロースの加水分解に影響を与えているものの，その作用機構は直接的な酵素阻害ではなく，発芽過程におけるインベルターゼ遺伝子の転写後の活性化機構の阻害である可能性が示された．このノジリマイシンの根寄生雑草中の作用点は，根寄生雑草選択的な除草剤の標的となりうることから，現在これを明らかにすべく研究を進めている．同時に，ヤセウツボの発芽過程についてはトランスクリプトーム解析を行っており，取得した遺伝子配列および発現情報からも，その発芽において重要な役割を果たすと考えられる分子の探索を進めている．本講演では，これらの知見をもとにした根寄生雑草選択的除草剤の実用化戦略についても思うところを述べたい．

planteose, root parasitic weeds, selective herbicides

発表責任者：岡澤　敦司（okazawa@plant.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：4SY03-1
講演日時、会場：3 月 20 日 09:00～ C22 会場

# DNA メチル化による遺伝子発現調節を介した代謝制御

# Mechanism of metabolic gene regulation via DNA methylation

○亀井 康富（京都府立大生命環境）
○Yasutomi Kamei (Kyoto Pref Univ)

成人期に発症する生活習慣病は典型的な多因子疾患であるが、環境因子と遺伝素因の複雑な相互作用の分子基盤の一つとして、塩基配列の変化を伴わない後天的な遺伝子発現制御（エピジェネティクス）が関与することは想像に難くない。疫学調査や動物モデルを用いた研究により、我々の生体内では胎児期の栄養環境が何らかの形で記憶され（メタボリックメモリー）、その後の肥満症や生活習慣病の「易発症性」が少なからず規定されるという概念がある（developmental origins of health and disease）。この記憶の仕組みとして遺伝子の塩基配列の変化を伴わないエピジェネティックな遺伝子発現制御機構が想定される。胎児期～新生児期は器官が形成される可塑性の高い時期であり、この時期の栄養状態や摂取する食品成分により成人期の肥満や生活習慣病の易感受性が決定される可能性がある。

エピジェネティクス情報は、ひとたびゲノム上に書き込まれると安定して次世代の細胞に伝えられるが、個体発生においては DNA のメチル化状態がダイナミックに変化する。DNA メチル化反応は、DNA メチル化酵素（Dnmt3a, Dnmt3b あるいは Dnmt1）によって触媒される。本研究では、マウスの新生仔期に DNA メチル化により遺伝子発現が変動する脂肪代謝関連遺伝子を同定し、成獣期に発症する生活習慣病との関連を明らかにすることを目指した。DNA メチル化の網羅的解析法である MIAMI 法（Microarray-based Integrated Analysis of Methylation by Isoschizomers）により、胎仔期～新生仔期～成獣期のマウスの肝臓および新生仔肝臓初代培養における DNA メチル化状態を網羅的に解析した。さらに cDNA 発現マイクロアレイ法により、胎仔期～新生仔期～成獣期のマウスの肝臓において発現が変化する遺伝子との比較を行なった。その結果、脂質代謝関連の遺伝子群が DNA メチル化変化を介して発現制御を受けることが明らかになった。さらに骨格筋機能における DNA メチル化酵素による遺伝子発現調節についても解析を進めている。本研究成果を、新生児期の栄養学的介入の形で応用することにより、肥満・生活習慣病の新しい予防戦略の手がかりになることが期待される。

多くの疫学研究やモデルマウスを用いた研究により、これまで遺伝素因によるところが大きいと考えられてきた「太りやすい」体質の原因に、栄養環境を含めた環境因子が少なからず影響を与えていることが明らかとなりつつある。肥満あるいは生活習慣病におけるエピジェネティクス制御の分子機構が明らかになることにより、その知見を踏まえた栄養環境づくりや食品由来成分によるエピジェネティクス情報の維持などによる、太りにくいあるいは疾患になりにくい体質づくりという根本的な肥満・生活習慣病の予防法の確立につながることを期待したい。

DNA methylation, metabolic disease, nutrition

発表責任者：亀井康富（kamei@kpu.ac.jp）

講演番号：4SY03-2
講演日時、会場：3 月 20 日 09:30～ C22 会場

# アリルごとの DNA メチル化状態に注目したエピジェネティクス研究の新たな試み

# A novel approach for epigenetic study focusing on allele-dependent DNA methylation patterns

○大鐘 潤[1]、新井 良和[2] ([1]明治大農、[2]宮崎大農)
○Jun OHGANE[1], Yoshikazu ARAI[2] ([1]Meiji Univ, [2]Miyazaki Univ)

DNAメチル化は、哺乳類では5’CG3’と並ぶCpG二塩基のシトシンで起こる。遺伝子プロモーター領域でのシトシンメチル化は遺伝子発現を抑制し、細胞分裂後も継承される細胞種特異的な遺伝子発現の記憶装置として機能する。組織は複数の細胞種からなり、一般に組織中の細胞で遺伝子が転写可能な場合には、その遺伝子の転写制御領域は低メチル化状況にある。しかし、組織全体のDNAメチル化解析では、組織内で割合が高い細胞種のメチル化状況が結果に反映されやすい。このため、組織中のごく一部の細胞種から発現する遺伝子では、組織全体のメチル化状況と遺伝子発現が相関しないことがある。バイサルファイトシークエンス法による DNAメチル化解析では、配列を決定したフラグメントごとの結果が 1 つのアリル(細胞)に由来すると考えられる。そのため、低メチル化のフラグメントは遺伝子が活性化状態にある細胞由来と考えることができる。そこで組織内での細胞種特異的なDNAメチル化状態を同定する試みとして、複数のホルモン産生細胞、前駆細胞や幹細胞など多様な細胞種から構成されるブタの脳下垂体について、次世代シーケンサーを用いたウルトラディープアンプリコン解析によるDNAメチル可変領域の検出を試みた。次世代シーケンサーを用いたバイサルファイト法によるDNAメチル化解析の結果、 従来のサンガー法での数十フラグメント程度のシークエンス解析での組織全体の比較ではメチル化状況の差が小さく検出が困難であった遺伝子についても、細胞種に特異的と考えられるDNAメチル化可変領域を同定できた。さらに、従来のメチル化解析結果の解釈である、解析領域に含まれる全 CpG についての DNA メチル化率からは高メチル化状況を示した遺伝子についても、次世代シーケンサーで読まれたフラグメントごとのメチル化状況に注目することで、遺伝子が活性化状態にあると考えられるアリル(細胞)を示すことができた。以上より、脳下垂体に含まれるホルモン産生細胞、およびごくわずかに存在する幹細胞で発現する遺伝子について、DNAメチル化によって制御されると考えられる領域を検出できた。 本シンポジウムでは、アリルごとのメチル化状況に注目した新たな視点で、非げっ歯類哺乳類の多能性幹細胞の評価やハプロ不全優性遺伝病で同じ変異アリルをヘテロ接合性に持つにも関わらず患者ごとに発症・重篤化度合いが違うことの分子メカニズムとしてエピジェネティクスが関与する可能性などについて紹介する予定である。

DNA methylation, Cellular differentiation, Epigenetics

発表責任者：大鐘　潤（johgane@meiji.ac.jp）

講演番号：4SY03-3
講演日時、会場：3 月 20 日 10:00～ C22 会場

# ヒドロキシメチルシトシン、メチルシトシンの新しい解析手法とその応用

# Development and application of nobel method for the identification of methylcytosine and hydroxymethylcytosine.

○幸田 尚（東京医歯大難研）
○Takashi Kohda (Med. Res. Inst., Tokyo Med. Dent. Univ.)

ゲノムのエピジェネティックな修飾による遺伝子発現制御は、細胞分裂を経てある程度安定的に娘細胞に伝達されるため、一度確立されると長期にわたって遺伝子発現の制御を変化させる。ゲノム DNA のシトシンのメチル化修飾はエピジェネティック修飾の中でも古くから研究されてきた主要なものの一つである。哺乳類においては維持メチル化を担う DNMT1 と新たにメチル化を獲得するのに必要な DNMT3a/b が知られ、メチル化については盛んに研究されてきた。一方、脱メチル化の機構については長らくその詳細が不明であったが、2009 年に TET 遺伝子産物がメチルシトシン(mC)をヒドロキシメチルシトシン(hmC)へ酸化する反応を触媒することが明らかとなって以来、能動的な脱メチル化の機構について注目が集まっている。また、hmC は mC の能動的脱メチル化過程の重要な中間体であるだけでなく hmC 自身も転写調節に重要な役割を担っている可能性を示唆する報告も増えている。また、TET 酵素は基質としてクエン酸回路の中間体である 2-オキソグルタル酸を必要とすること、また活性の維持に二価の鉄を要求し、アスコルビン酸によってその活性が高くなることが知られている。これらのことは、生体の恒常性維持の基盤の一つであるエピゲノム情報が TET 酵素群を介して栄養環境などの影響を大きく受ける可能性を示している。

一方、hmC の検出、同定法はいくつか提案されているが、必ずしも満足できるものではなかったため、我々は新たな hmC の 1 塩基レベルでの解析法必要であると考え、hmC の解析法の開発を行い、95%以上の高精度での解析に成功し、Enzyme-assisted Identification of Genome Modification Analysis (EnIGMA)法と名付けた。この手法は、単純な原理に基づいて高い精度での解析が可能であること、DNA の同一分子上で mC、hmC と非修飾のシトシンを同時に解析できるという利点を持っている。さらに我々は EnIGMA 法を次世代シークエンサーによるゲノムワイドの解析にも適用することに成功している。本シンポジウムでは EnIGMA 法の原理と利点について報告するとともに、mC の酸化的修飾塩基を解析することの意義についても考察する。

epigenetics, hydroxymethylcytosine, methylcytosine

発表責任者：幸田　尚（tkohda.epgn@tmd.ac.jp）

講演番号：4SY03-4
講演日時、会場：3 月 20 日 10:30～ C22 会場

# 優劣性を制御する低分子 RNA
# *Trans*-acting small RNA that determines dominance relationships

○高山 誠司[1,2] ([1]東大農、[2]奈良先端大バイオ)
○Seiji TAKAYAMA[1,2] ([1]Univ. Tokyo, [2]NAIST)

有性生殖により子は両親より 1 組ずつの遺伝子セットを受け継ぐが、いずれか一方の親の形質のみが現れる場合が多く認められる。これは優劣性としてメンデルの時代から知られる現象であるが、個々の機構については未解析のまま残されている場合が多い。これまで唯一知られてきたのが劣性側対立遺伝子の機能欠損であり、酵素などの場合には片方の対立遺伝子からの発現量でも十分な機能が賄えるために野生型対立遺伝子の形質が優性になると説明されてきた。一方、我々は、植物の自家不和合性の自他識別を司る対立遺伝子間の優劣性について解析する中で、劣性側対立遺伝子の発現がエピジェネティックに抑制されるという全く異なる仕組みの存在を発見した。

自家不和合性は、多くの顕花植物が有する近親交配を避ける機構であり、種の遺伝的多様性の維持に寄与している。アブラナ科植物の自家不和合性における自他識別は、*S* 遺伝子座上の多数のハプロタイプ（$S_1$, $S_2$, ---, $S_n$）により制御されている。各 *S* ハプロタイプは、リガンドとして機能する花粉因子 SP11 とその受容体として機能する雌ずい因子 SRK をコードしており、両者の *S* ハプロタイプ特異的な相互作用により不和合性反応が誘起され受精が阻害される。花粉因子 SP11 は胞子体(2*n*)である葯タペート組織で作られるため、花粉は通常 2 種類の *S* ハプロタイプを表現型として持ち、これらの *S* ハプロタイプを表現型として持つ雌ずいとは不和合となる。しかし、*SP11* 対立遺伝子間にはしばしば複雑な優劣性関係が認められ［*Brassica rapa* の例：($S_8 = S_9 = S_{12} = S_{52}$) > ($S_{44} > S_{60} > S_{40} > S_{29}$)］、花粉が 1 つの *S* ハプロタイプの表現型しか示さない場合が多く認められる。この優劣性の存在は、近親交配の機会を招く一方で、交配可能な相手を増やすという側面も持つ。アブラナ科を始め胞子体型自家不和合性を持つ多くの植物がこの優劣性関係を進化させており、この後者の側面が氷河期など集団内の個体数が減少した際の種の存続に有利に作用したものと推測されている。

我々は、*B. rapa* における上記の複雑な優劣性関係が、2 種類の多型性をもつ 24 塩基の低分子 RNA によってエピジェネティックに制御されていることを明らかにした。すなわち、優劣性を示す全ての *S* ヘテロ体において、優性側の *S* ハプロタイプ上の逆位反復配列に由来する 24 塩基からなる低分子 RNA が劣性側の *SP11* プロモーター領域に高い相同性を示し、当該領域の DNA メチル化を誘導し、その発現を抑制していることを明らかにした。我々が見出した低分子 RNA は、20 世紀初頭における優劣性機構に関する論争の中で Ronald A. Fisher が提唱した"Dominance modifier"に相当する。今回見出された新たな優劣性制御の仕組みについて、進化上の意義と合わせて紹介したい。

dominance relationship, small RNA, self-incompatibility

発表責任者：高山　誠司（a-taka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4SY03-5
講演日時、会場：3 月 20 日 11:00～ C22 会場

# エピゲノム創薬を目指したヒストン修飾のリアルタイムイメージング
# Real-time imaging of histone modifications for application to epigenetic drug discovery

○吉田 稔（理研・環境資源セ）
○Minoru Yoshida (RIKEN CSRS)

発生過程でゲノムに刷り込まれたエピジェネティックランドスケープは、加齢やストレスなどの要因によって変化しうる脆弱なものであり、その異常が多くの疾患と関わっている。エピジェネティクス制御において中心的な役割を果たすヒストンの修飾は、それらの「書き込み」と「消去」を担う各修飾酵素の発見と「読み取り」機能を担う修飾特異的結合因子の同定によって分子レベルでの理解が深まってきた。アセチル化、メチル化などのヒストン修飾は多くの疾患にその異常が見られることから、これらの翻訳後修飾は疾患治療薬の標的としても注目を集めている。我々はトリコスタチン A をはじめとするヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害剤の発見などを通じ、化合物によるクロマチン機能の制御と疾患治療への応用を目指したケミカルバイオロジーを推進してきた。HDAC 阻害剤はすでにいくつかの血液がんの治療薬として実用化され、ヒストンメチル化阻害剤も臨床研究が始まっている。ところが、これらのヒストン修飾の検出は、特異的な抗体に依存しており、生細胞での観察は困難であった。我々はヒストンアセチル化の変化を生細胞で可視化するため、アセチル化ヒストンを認識するブロモドメインをヒストン H4 と適当な長さのリンカーによって結び、その両端に蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を起こす２つの蛍光タンパク質 CFP と Venus をつけたプローブを作成した。この蛍光プローブはクロマチンに取り込まれ、ヒストン H4 部分がアセチル化されることにより、分子内のブロモドメインが結合して構造変化が起こり、FRET 変化が観察された。この原理を応用して、さまざまなアセチル化部位特異的プローブの開発を実現した。さらに最近、ヒストン H3K9 のトリメチル化を認識する HP1 のクロモドメインを用いてヒストン H3 トリメチル化を可視化することにも成功した。これらを用いて細胞内でのヒストン修飾動態の変化がそれぞれの阻害剤の性質を反映することが明らかになった。ヒストン修飾可視化プローブの有用性と今後の課題について討論したい。

histone, acetylation, imaging

発表責任者：吉田　稔（yoshidam@riken.jp）

講演番号：4SY03-6
講演日時、会場：3 月 20 日 11:30～ C22 会場

# 妊娠中のタンパク質栄養と成長後の血圧をつなぐエピジェネティック制御

# Epigenetic regulation bridging maternal protein nutrition and the blood pressure of offspring

○加藤 久典、三好 萌、斉藤 憲司、大谷 りら（東大総括プロ）
○Hisanori Kato, Moe Miyoshi, Kenji Saito, Lila Otani (Univ. Tokyo)

妊娠期の胎児期から乳幼児期にかけての環境、特に栄養状態や摂取する食物が成人後の高血圧、脳卒中、糖尿病などの生活習慣病の発症と密接に関連していることが示されてきた。この developmental origins of health and disease（DOHaD）仮説に関し、分子レベルでの機構解析も進んで来ており、特にエピジェネティックな変動を伴っている証拠が多く示されてきた。演者らもラットを用いて、胎児期あるいは授乳期の一時的なタンパク質栄養悪化や特定のアミノ酸摂取によって成長後に表出する現象の解析を進めてきた。本日は、妊娠期タンパク質制限による子の高血圧状態の憎悪に関して、SHRSP ラット（脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット）を用いた研究例を紹介する。

胎児期の栄養環境が成長後の血圧上昇の要因となることは，高血圧患者の多い日本では，無視できない問題である。これまでに、SHRSP において妊娠中に穏やかなタンパク質制限を受けた母から生まれた仔は，十分なタンパク質を摂取した母の仔と比べて，成長後の食塩負荷による血圧上昇が著しく，生存期間が劇的に短縮することを見出している。興味深いことに，同様の影響は孫の代においても認められた。この機構を探るため、腎臓で DNA マイクロアレイ法による網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、妊娠中タンパク質制限を受けた子や孫で共通して変化していた遺伝子として、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系（RAAS）やカリクレイン・キニン系（KKS）に関連した遺伝子が含まれていた。タンパク質レベルでの解析において、RAAS の構成要素の一つアンジオテンシン受容体 type 2 (AT2R)の腎臓や副腎での量が胎児期低タンパク質暴露や食塩負荷の影響による影響を強く受けることが明らかとなった。この変化において、エピジェネティックな変化が関わっているかを探るため、同遺伝子（*Agtr2*）プロモーター周辺領域における腎臓の DNA メチル化パターンを調べた。まず転写開始点付近-266 から+73 までの 4 個所についてバイサルファイト法により解析したところ、2 個所について妊娠期タンパク質摂取および食塩負荷によるメチル化の変化が見られた。AT2R のタンパク質量と比較すると、これらの位置のメチル化はこの遺伝子の発現をむしろ上昇させる可能性が考えられた。さらに、胎児期低タンパク質曝露を受けた子の成長後の腎臓を用いてメチローム解析を行ったところ、プロスタグランジン E2 レセプターをコードする *Ptger1* 遺伝子内の腎臓での DNA メチル化が高まっていることがわかった。

protein nutrition, methylation, blood pressure

発表責任者：加藤久典（akatoq@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

# 実行委員会企画シンポジウム（コミッティー・シンポジウム）

農芸化学は，生命・食・環境に代表される「化学と生物」に関連したことがらを，基礎から応用まではば広く研究する学問分野である．その年次大会のシンポジウムとして「いまさら聞けない農芸化学」を企画した．多様に拡がる農芸化学分野から，分野･キーワードをピックアップし，その現状や今後の展開について，それぞれを代表する講演者の先生方に，学生･企業研究者を含む一般参加者に向けて，大学院講義レベルの平易な言葉で解説して頂き，ご自身の研究，国内外の研究の現状，問題点，今後の展開について自由にお話し頂く．

このような“コミッティー・シンポジウム”の開催を通して，アカデミアのみならず，学生から民間企業に至る幅広い多様な参加者に向けて「農芸化学」の情報発信をしたいと考えている．

**3月18日(土) 9:00〜12:00，3月19日(日) 9:00〜12:00**

## 2CS01　いまさら聞けない農芸化学〜キーワード編〜

3月18日（土）9:00〜12:00　C16会場（C校舎　3階　311）
世話人：河内孝之（京大院生命），森　直樹（京大院農）
座　長：河内孝之（京大院生命），森　直樹（京大院農）

9:00　2CS01–1　タンパク質構造から計算化学で試薬を選びアッセイまでの最短コース……◦福西快文（産総研）
9:30　2CS01–2　分離分析の最新技術－high resolution LC-MS/MS をもちいたプロテオーム解析－……◦石濱　泰（京大院薬）
10:00　2CS01–3　蛍光バイオセンサーを用いた生細胞内可視化技術……◦今村博臣（京大院生命）
10:30　2CS01–4　CRISPR の発見からゲノム編集技術への応用までを辿る……◦石野良純（九大院農）
11:00　2CS01–5　エピジェネティクスによる生命機能制御：基本メカニズムから人為的操作の可能性まで……◦原田昌彦（東北大院農）
11:30　2CS01–6　ゲノム配列決定技術の現状と今後の展望……◦豊田　敦（遺伝研比較ゲノム）

## 3CS01　いまさら聞けない農芸化学〜分野編〜

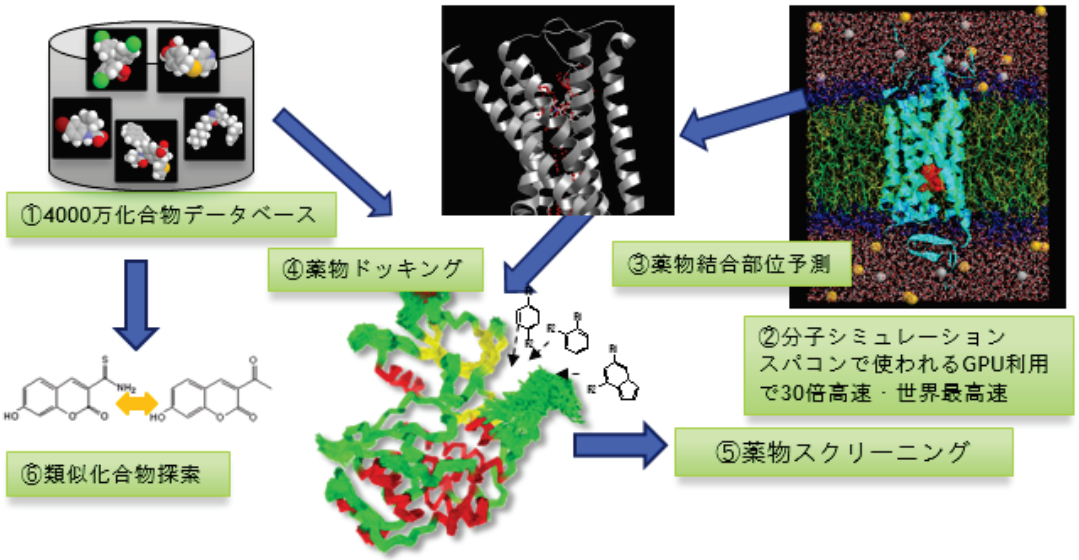
3月19日（日）9:00〜12:00　C16会場（C校舎　3階　311）
世話人：阪井康能（京大院農），亀井康富（京府大生命環境）
座　長：阪井康能（京大院農），亀井康富（京府大生命環境）

9:00　3CS01–1　選択的生物制御の道を拓くアグリケミカルバイオロジー……◦松田一彦（近大農）
9:30　3CS01–2　酵素機能電極反応の理論に基づいたバイオ電池の新展開……◦加納健司（京大院農）
10:00　3CS01–3　モノクローナル抗体あれこれ……◦成田宏史（京女大食物）
10:30　3CS01–4　微生物および酵素・触媒研究……◦小林達彦（筑波大院生命環境）
11:00　3CS01–5　微生物生化学と菌叢構造解析……◦中山　亨（東北大院工）
11:30　3CS01–6　嗅覚研究にみる農(芸)化学と脳科学の融合……◦東原和成（東大院農生科）

講演番号：2CS01-1
講演日時、会場：3 月 18 日 09:00～ C16 会場

タンパク質構造から計算化学で試薬を選びアッセイまでの最短コース
From protein structure to assay by Structure-Based Drug Design
○福西 快文（産業技術総合研究所）
○Yoshifumi Fukunishi (AIST)

Computer-Aided Drug Design の概説を行う。計算創薬は、今では国産ソフトウェアの改良が進み、
・大学生でも操作が可能、
・価格は年間ライセンス 100 万円以下、
・PC１台でも、クラウドの利用もでき、200 万化合物の探索は最速１時間・3500 円で済む。
アッセイも含め外注で済み、ドライな居室からでも、実験が可能になった。




（１） 化合物データベース： 世界で 4000 万化合物（１化合物１万円）が入手できる。
（２） ドッキング計算： １回２秒で済む
（３） スクリーニング計算： 計算で選んだ化合物は平均３－５％で活性化合物が見いだせる
（４） 試薬購買方法について、： 日本は世界的に入手が楽
（５） 市販ソフトの利用法と合わせて説明する。
説明の基本には、創薬支援ソフトウェア・myPresto を使う
無償 DL サイト：http://presto.protein.osaka-u.ac.jp/myPresto4/index.php?lang=ja
情報公開サイト：http://ma.cms-initiative.jp/ja/index/listapps/mypresto
既に数千回ダウンロードされ、国内製薬企業・研究所など４０機関で使われている。

Structure-based drug development, Protein-compound docking, Virtual screening

発表責任者：福西快文（y-fukunishi@aist.go.jp）

講演番号：2CS01-2
講演日時、会場：3 月 18 日 09:30～ C16 会場

# 分離分析の最新技術－high resolution LC-MS/MS をもちいたプロテオーム解析－
# New technology in separation science - proteome analysis by high resolution LC-MS/MS

○石濱 泰（京大薬）
○Yasushi Ishihama (Kyoto Univ)

質量分析(MS)は試料イオンをその質量電荷比(*m/z*)の違いによって分離する分離分析法であり，ポストゲノム時代において、複雑でダイナミックレンジの広い生体試料中の成分を一斉分離するために急速に発展した機器分析法の一つである。その分離空間はマスアナライザーの分解能に依存しているが、分離空間のさらなる拡張には、高精度かつ高分解能を有するマスアナライザーである TOF やオービトラップを、四重極やイオントラップと組み合わせたハイブリッド型タンデム MS が用いられる。しかしゲノム規模の複雑性を持つ試料を分離するには、*m/z* に基づく分離だけでは不十分であり、*m/z* とは完全に独立した分離次元が必要とされる。エレクトロスプレーイオン化(ESI)法を介したオンライン LC は、MS に時間という新たな分離軸を与えるだけではなく、現行の MS の最大の弱点である定量性の向上に大きな効果をもたらす。さらに、LC および ESI のミクロ化効果により、高感度化も期待できる。

一方、LC における高分離能の実現には、カラム充填剤を微小化するか、もしくは長いカラムを用いることが必要となる。しかしいずれの場合もカラム圧の上昇につながるため、高分離能の実現には、できるだけ高い圧力下における分離条件の最適化を行い、分析時間の許容範囲と必要な分離の妥協点を探ることになる。我々は、プロテオーム完全解析を目標として、メートル長のモノリス型シリカキャピラリーカラムを用いたナノ LC とハイブリッド型タンデム MS を用いた high resolution LC-MS/MS システムの開発を進めてきた。細胞から抽出したタンパク質をトリプシン等の消化酵素で切断したペプチド混合物を試料として用いる「ショットガンプロテオミクス」を採用し、数時間から数十時間のグラジエント溶出を行い、数マイクログラムのペプチド試料から約 1 万種のタンパク質を同定・定量するシステムを確立している。さらにリン酸化修飾等の翻訳後修飾プロテオームを解析するシステムやタンパク質末端の大規模解析システムを確立し、プロテオーム変動解析を行っている。本講演では、安定同位体標識を用いた測定のマルチプレックス化やデータ非依存性測定(DIA)モードによる定量法などを本 high resolution LC-MS/MS システムと組み合わせ、ダイナミックで複雑なヒトプロテオーム解析に対し、我々が分析化学的にどのように立ち向かってきたかについて紹介する。さらには将来必要とされる関連テクノロジーについても議論したい。

mass spectrometry, high resolution LC, proteome analysis

発表責任者：石濱　泰（yishiham@pharm.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2CS01-3
講演日時、会場：3 月 18 日 10:00～ C16 会場

# 蛍光バイオセンサーを用いた生細胞内可視化技術

Live cell imaging with fluorescent biosensors

○今村 博臣（京大生命）
○Hiromi Imamura (Kyoto Univ.)

２０年ほど前から、様々な蛍光タンパク質の開発が進んで遺伝子工学的な利用が可能になったことにより、細胞を生かしたまま様々な細胞内情報を画像化・測定する技術に大きな革新がもたらされた。すなわち、蛍光タンパク質と他の機能的タンパク質を組み合わせることによって、イオン濃度やシグナル伝達系酵素の活性等を光のシグナルへと変換する蛍光バイオセンサーを開発できるようになったのである。これらの蛍光バイオセンサーを発現する細胞を蛍光顕微鏡でイメージングすることによって、生きた細胞内情報の時空間的な情報を、単一細胞レベルで得ることが可能となり、特に細胞内シグナル伝達研究は大きく進展した。

ところが、細胞内シグナル伝達をイメージングするための蛍光バイオセンサーの開発が精力的に進められてきた一方で、代謝物に対する蛍光バイオセンサーの開発は大きく遅れていた。従来、代謝物量を分析するためには、組織や細胞を破壊して得られた抽出液をクロマトグラフィーや質量分析等で調べるという方法が一般的であったため、細胞内における代謝物の時空間的な動態は不明であった。しかし、細胞内・生体内の代謝物動態を知ることは、生理学的な観点のみならず、細胞や生物を利用した物質生産の観点からも重要だと考えられる。我々は、代謝物の中でも特に重要だと考えられる ATP に対する蛍光バイオセンサーの開発を進め、生細胞内の ATP 濃度をイメージングする技術を確立してきた。さらに、その技術を用いて、細胞内の ATP 濃度のダイナミクスや分布を明らかにしてきた。タンパク質のみで構成されるバイオセンサーの特徴のひとつは、細胞内局在化タグを付加することで、細胞の任意の場所にバイオセンサーを局在化できるという点である。この特徴を利用することで、細胞質だけではなく、核やミトコンドリアマトリックスなど、細胞内コンパートメント特異的な ATP 濃度を知ることが可能となった。また、蛍光バイオセンサーをコードする cDNA をゲノムに組み込むことで、恒常的に ATP バイオセンサーを発現する細胞や生物をつくり出すことにも成功している。

本発表では、ATP の話題を中心に、生細胞内可視化技術の現状と今後の展望について広く話題を提供する予定である。

fluorescent biosensor, bioimaging, resonance energy transfer

発表責任者：今村博臣（imamura@lif.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2CS01-4
講演日時、会場：3 月 18 日 10:30～ C16 会場

# CRISPR の発見からゲノム編集技術への応用までを辿る

# CRISPR ~from discovery to genome editing technology

○石野 良純（九大農）
○Yoshizumi Ishino (Kyushu Univ.)

生物は自らの遺伝情報の安定な維持と子孫への伝達のために、種々の DNA 代謝酵素を有する。DNA 複製、修復、組換えなどの生命の基本メカニズムを理解しようとする研究が、DNA に作用する酵素の発見に繋がり、試験管内で DNA を切り貼りする遺伝子操作技術をもたらしたことは、生物学研究における技術革新であった。その後、耐熱性 DNA ポリメラーゼの研究が PCR 技術の実用化に繋がり、遺伝子操作が顕著に簡便になった時に二度目の技術革新が起きた。最近脚光を浴びている RNA 誘導型ヌクレアーゼ CRISPR-Cas9 システムを利用したゲノム編集技術は、その簡便性の高さにより急速に普及し、三度目の技術革新をもたらしたと言える。演者は、普及し始めたばかりの遺伝子操作技術を用いて、大腸菌のリン酸代謝に関わる酵素の研究をしていた 1986 年に、奇妙な繰り返し配列を発見した。それは29ヌクレオチドからなる繰り返し単位が、配列保存性の無い32 ヌクレオチド長のスペースを挟んで規則正しく 5 回繰り返していた。29 鎖長の繰り返し配列には２回対称性の 14 ヌクレオチド配列が含まれていた。この特徴的な DNA 配列が生理的に何を担っているのか、当時は全くわからなかった。この研究成果は 1987 年に国際誌に発表したが、バクテリアに保存された二回対象の REP（repetitive extragenic palindromic）配列が mRNA の安定性に寄与することが知られていた例を基にして、この繰り返し配列が転写制御に関わる可能性を示唆した。これが後に CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) と呼ばれることになる配列の発見の時である。生命科学は 1990 年半ばからゲノム時代に入り、多くのゲノム配列が急速に解読されていった。CRISPR はほとんどのアーキアゲノム上に見つかり、バクテリアにも半数のゲノムが保有していることがわかっていった。また、CRISPR の近傍には保存された遺伝子クラスターが見つかり、それらが CRISPR と関連する機能を有していると予想されて *cas* (CRISPR-associated)と名付けられた。その後、CRISPR-*cas* が原核生物の獲得免疫機能を担うことが実験的に証明されると、研究者は、その機構をゲノム上の狙った位置での切断技術に応用できることに気付いた。そして、CRISPR- *cas9* は見事に実用的なゲノム編集技術として開花した。本講演では、筆者が 1987 年に発表した独特の繰り返し配列が 30 年の時を超えて思いがけなく CRISPR として有名になった軌跡を辿りながら、CRISPR-Cas9 システムを利用したゲノム編集技術の原理について紹介したい。

CRISPR-Cas, genome editing, genetic engineering

発表責任者：石野良純（ishino@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：2CS01-5
講演日時、会場：3 月 18 日 11:00～ C16 会場

# エピジェネティクスによる生命機能制御：基本メカニズムから人為的操作の可能性まで
# Regulation of biological phenomena by epigenetics

○原田 昌彦（東北大院農）
○Masahiko Harata (Tohoku Univ.)

遺伝学（ジェネティクス）により、ゲノム塩基配列と生物の表現形との関連性が明らかにされてきた。しかし、ゲノム塩基配列の変化を伴わない表現形変化も観察される。たとえば、生物の発生、分化、老化、環境対応、疾病などがそれにあたる。エピジェネティクスは、このような生命現象の制御機構の解明と応用を目指す分野である。

塩基配列に依存しない遺伝情報発現の制御のために、DNA は細胞核内でより高次な構造を形成している。それが「クロマチン」であり、DNA とヒストンタンパク質によって形成されるヌクレオソームが、その基本単位である。クロマチンの構造が変化することにより、ゲノム情報の発現、すなわち DNA 情報の RNA への転写量が時間的・空間的に制御される。このようなエピジェネティック制御により、同じ DNA 情報を持つ細胞が異なった細胞に分化するなどの、多様な高次生命機能を発現する。

エピジェネティック制御のために、クロマチン構造変化を担う様々なメカニズムが知られている。たとえばヒストン修飾（アセチル化、メチル化など）、クロマチンリモデリング複合体による ATP 依存的構造変換、ヒストンバリアント（異形ヒストン）の導入によるヌクレオソーム構造変化、などである。このようなヌクレオソームを対象としたメカニズムに加え、さらに細胞核内でのクロマチンの空間配置もクロマチン構造を制御している。細胞核レベルでのエピジェネティック制御については不明な点が多いが、我々は細胞核に存在するアクチンファミリーが重要な役割を果たすことを見出している。以上のような様々なメカニズムの協奏としてのエピジェネティック制御により、複雑な生命機能が発現している。一方で、このようなエピジェネティック制御の破綻は、がんなどの疾病につながる。

天然物や代謝産物の中には、エピジェネティック制御に影響を与える分子が存在する。たとえば、腸内細菌の代謝によって生産される酪酸は、ヒストン修飾酵素に影響を与え、遺伝子発現を変化させることが知られている。このような天然物・代謝物やその類縁体、あるいは抗体を利用することにより、クロマチン構造の人為的変化も試みられている、このようなエピジェネティクスの操作により、発生・分化やがん化などの生命現象を人為的に制御できる可能性もあり、本講演ではこれらについても論議したい。

epigenetics, chromatin, gene expression

発表責任者：原田昌彦（masahiko.harata.b6@tohoku.ac.jp）

講演番号：2CS01-6
講演日時、会場：3 月 18 日 11:30～ C16 会場

# ゲノム配列決定技術の現状と今後の展望

# Long read sequencing technologies and de novo assembly

○豊田 敦（遺伝研・比較ゲノム）
○Atsushi Toyoda (NIG)

次世代型シーケンサーの性能の向上や周辺機器、解析プログラムなどの開発により、生命現象の理解に向けてさまざまな生物種の新規ゲノム配列決定が行われ、検討すべき課題は残るものの比較的短期間にゲノム全体を鳥瞰することが可能となってきた。また、遺伝子発現や修飾塩基、1 細胞、ハプロタイプ、構造変異解析などについても次世代型シーケンサーを用いた大規模配列解析により迅速かつ網羅的にデータを取得できるようになってきている。しかしながら、極微量 DNA や高ヘテロ接合性を持つ生物種からのゲノム解読や構造変異解析において、これまでのショートリードを用いた解析では限界があり、ロングリード（疑似ロングリードを含む）の活用が必要不可欠な状況である。また、最近 10X Genomics 社を始め、Pacific Biosciences 社や Oxford Nanopore Technologies 社からロングリード技術や装置が次々と登場しており、その配列精度や出力されるデータ量などを飛躍的に向上させている。本講演では、我々が取り組んでいるロングリード技術を用いた全ゲノム解析を中心に実例を交えながら紹介する。

De Novo Assembly, NGS: Next-Generation Sequencing

講演番号：3CS01-1
講演日時、会場：3 月 19 日 09:00～ C16 会場

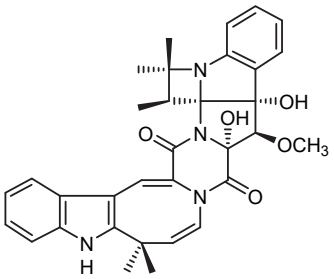
# 選択的生物制御の道を拓くアグリケミカルバイオロジー

# Agri-Chemical Biology Paving a Way for Selective Bioregulation

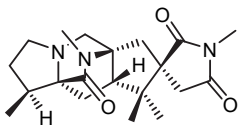
○松田 一彦（近大農・応生化）
○Kazuhiko Matsuda (Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Kindai University)

自然が生み出す生物活性物質は、生態系あるいは個々の生命の恒常性を維持するために生物間相互作用や細胞内のシグナルを調節する。特に微生物、昆虫、植物を選択的に調節する生物活性物質（ケミカルリガンド）は世界の農業生産を中心に応用されている。しかし、こうした応用の根底を支える生物基盤を深く理解していなければ、次代の環境保全型の高選択的生物制御に大きなブレイクスルーは期待できない。

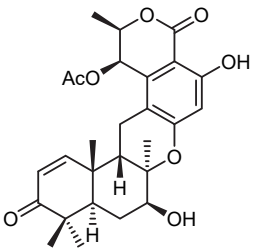
筆者は糸状菌が産生する昆虫制御物質のターゲット解明研究の一環として asperparaline、chrodrimanin、okaramine 類等の殺虫活性発現機構ついて研究した。これらの化合物はいずれもダイズのケミカルリガンドを含有する培地で糸状菌類により著量生産される。自身が展開した研究の結果、驚くべきことにいずれの化合物も極めて高い昆虫選択的神経活性を示すことがわかった。この偶然を超えた知見をふまえて、「応用から基礎へ」という理念のもと、関係分野の研究例に触れながら農芸化学の神髄である「化学と生物の境界領域」を探る。さらに、除虫菊の pyrethrin 生合成に関する研究を通じて、古典的であっても極めることで普遍的な事実を知る「温故知新」の重要性も述べる。



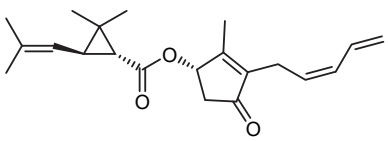

**Okaramine B**




**Asperparaline A**




**Chrodrimanin B**




**Pyrethrin I**

Agri-Chemical Biology, Selective Regulation, Target Identification

発表責任者：松田　一彦（kmatsuda@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：3CS01-2
講演日時、会場：3 月 19 日 09:30～ C16 会場

# 酵素機能電極反応の理論に基づいたバイオ電池の新展開

# Development of Enzymatic Biofuel Cells Based on a Theory of Electro-Enzymatic Reactions

○加納 健司（京大農）
○Kenji Kano (Kyoto Univ.)

酵素バイオ電池は，電極触媒として酸化還元酵素を用い，生物が利用できる多種多様な還元物質（食物）を燃料とし，化学エネルギーを電気エネルギーに変換するデバイスである．温和な条件で作動する次世代型エネルギー変換装置として，世界的に注目されている．そのカギとなる反応過程は酵素反応と電極反応を共役系であり，基質の物質輸送過程と複雑な酵素－電極反応過程から成る．したがってその解析は容易ではなく，これまであいまいな解析のゆえ適切な特性評価ができず，経験的な対応に頼って性能向上を試みてきた面を否定できない．

そこで，この酵素－電極反応を複数の逐次定常反応過程から成るものとみなし，全反応速度定数 $k$ を $\frac{1}{k}=\sum\frac{1}{k_i}$ として表現し，各段階の最大反応速度定数 $k_i$ を厳密に評価できるようにした．この数式化によりバイオ電池性能を向上させるための具体的指針を明確に議論できるようになった．結果的に，1) ガス性基質移動促進のためのガス拡散バイオ電極の創成，2) 静電相互作用を基礎とした電極修飾による酸化還元酵素の配向制御，3) 多孔性電極の曲率効果を利用した酵素－電極間の距離 d の短縮による長距離電子移動速度定数 $k$ の向上（$k=k^{\circ}\exp(-\beta d)$），4) 直線自由エネルギー関係（$\ln\left(\frac{k_j}{k_i}\right)=\alpha\ln\left(\frac{K_j}{K_i}\right)$）に基づいたメディエータ選択による酵素－メディエータ間電子移動の効率化を行った．

その結果，（いずれも非拡販条件で）メディエータを用いるグルコース/$O_2$ バイオ電池として約 10 mW $cm^{-2}$ という太陽電池並みの出力が得られた．より難しいメディエータを用いないバイオ電池系の例として，フルクトース/$O_2$ バイオ電池として約 3 mW $cm^{-2}$，$H_2/O_2$ バイオ電池として約 10 mW $cm^{-2}$ と世界トップの性能を実現できた．この $H_2/O_2$ バイオ電池の起電力は理論値 1.23V に極めて近い値で，無機触媒電池では実現できない性能を示す．また，ギ酸と $CO_2$ のバイオ電解としてそれぞれ，約 100 mA $cm^{-2}$ および約 10 mA $cm^{-2}$ を実現している．このギ酸と $CO_2$ の交互変換系は過電圧がほぼゼロであり，このような変換系は無機触媒では実現できていない．

これらの特性はいずれも酵素機能電極の極めて優れた機能を示すもので，今後，バイオ電池，バイオリアクターのみならず，バイオセンサ開発にも極めて有用となると信じている．

biofuel cells, enzyme functional electrode, ordered steady state reactions

発表責任者：加納健司（kano.kenji.5z@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3CS01-3
講演日時、会場：3 月 19 日 10:00～ C16 会場

# モノクローナル抗体あれこれ
# Monoclonal Antibodies in Food Science

○成田 宏史（京女大食物）
○Hiroshi NARITA (Kyoto Women's Univ.)

今を去る事４０年前，研究室のセミナーで「モノクローナル抗体（モノクロ）：抗原の純化を必要としない抗体の取り方」が紹介された。当時修士課程に在籍し，赤血球の酵素を純化して抗体を採ろうとしていた私には，その手法は正確には理解できないほど驚愕であったが，いつかやってみたいと思っていた。オーバードクターのときに何か新しいことをやってみろと言われて，当時は未だ純化されていなかった造血ホルモン・エリスロポエチンに対するモノクロを採って一躍世界のトップに立ってやろうと企てた。結果は２番だったが，それ以来５０種を超える抗原に対するモノクロを採って来た。中にはモノクロならではの成果が得られた面白いものがあり，「今更聞けない・・・」が「今更聞いても・・・」とならないように，失敗談も交えて食品学分野で使えるモノクロをいくつか紹介したい。

１）Targeted 抗体編
・オボムコイド抗体：タンパク質の変性・未変性を区別できる
・Pyrroloquinoline quinone (PQQ)抗体：低分子化合物の方向を区別できる
・ミオグロビン抗体：牛肉と豚肉を区別できる
・Lipid Transfer Protein (LTP)抗体：ビールの品質管理に使える
・Gibberellin Regulated Protein (GRP)抗体：種特異的抗体と交差反応性抗体

２）Unexpected 抗体編
・ヘテロクリティック抗体：用いた抗原より，その類似体に高い親和性を示す
・コンタミに対してとれた抗体：新規アレルゲンの発見

３）Modified 抗体編
・オリゴクローナル抗体：モノクロをカクテルする
・一本鎖抗体：遺伝子組換え抗体

monoclonal antibody, antigen, food allergy

発表責任者：成田宏史（narita@kyoto-wu.ac.jp）

講演番号：3CS01-4
講演日時、会場：3 月 19 日 10:30～ C16 会場

微生物および酵素・触媒研究
Studies on microorganisms and enzymes/biocatalysts
○小林 達彦（筑波大・生命環境）
○Michihiko Kobayashi (Univ. Tsukuba)

生命活動において、実質的に重要な代謝機能を担っているのはタンパク質・酵素である。微生物にはまだまだ多くの未知なる現象が存在し、微生物および酵素が持つ多様な潜在機能を探索・開発することは、有用物質を生産する上で重要である。農芸化学は応用微生物学・応用生物化学・生物生産化学・生物有機化学・食品科学など幅広い分野をカバーするが、筆者らの昨今の研究はこれら全ての分野にまたがりつつある。本講演では日頃、意識している以下の４点そして筆者らの研究成果を中心に、微生物および酵素・触媒研究について講演させて頂く。

（１）「スクリーニングする」:
材料を探して取ってくる。未知の代謝や新規な酵素を探索する。酵素活性向上のための培地の誘導剤を探索する。どのような化合物が基質になるか探索する。

（２）「見逃さない」:
何気ないことでもそのままにせず、また、不思議なことやユニークな現象、思いもしない現象に注意を払う。

（３）「モノとして取る」:
代謝産物や酵素反応産物を化合物として取って同定する。酵素やタンパク質を精製し同定する。遺伝子をクローニングする。遺伝子を発現させ酵素・タンパク質を大量に作る。化合物を大量に生産する系を構築する。

（４）「基礎研究と応用研究」:
基礎研究から応用研究を行ってもよく、一方、応用から基礎に研究を進めてもよい。大規模オーム的・網羅的解析とは違い、ボトムアップ研究で開拓できる研究はまだまだある。

**関連論文, 他**: ***PNAS*****,** 90, 247 [1993]; ***PNAS*****,** 92, 714 [1995]; ***PNAS*****,** 93, 4267 [1996]; ***PNAS*****,** 93, 10572 [1996]; ***JBC*****,** 271, 15796 [1996]; ***PNAS*****,** 94, 36 [1997]; ***PNAS*****,** 94, 11986 [1997]; ***PNAS*****,** 95, 12787 [1998]; ***Nature Biotechnol.*****,** 16, 733 [1998]; ***JBC*****,** 276, 23480 [2001]; ***JBC*****,** 277, 45860 [2002]; ***JBC*****,** 278, 29600 [2003]; ***PNAS*****,** 101, 14031 [2004]; ***PNAS*****,** 101, 13726 [2004]; ***JBC*****,** 279, 47619 [2004]; ***JBC*****,** 280, 8660 [2005]; ***PNAS*****,** 103, 564 [2006]; ***JBC*****,** 283, 11312 [2008]; ***PNAS*****,** 105, 14849 [2008]; ***JBC*****,** 284, 14930 [2009]; ***Biochemistry*****,** 49, 9638 [2010]; ***JBC*****,** 285, 34793 [2010]; ***PNAS*****,** 108, 6615 [2011] ; ***PNAS*****,** 110, 2810 [2013] ; ***PNAS*****,** 111, 17152 [2014] ; ***JBC*****,** 291, 1735 [2016] ; ***PNAS*****,** 113, 9087 [2016]; *バイオテクノロジーの教科書* **[上巻・下巻]（講談社ブルーバックス）**[2014]

Microorganim, Enzyme

講演番号：3CS01-5
講演日時、会場：3 月 19 日 11:00～ C16 会場

# 微生物生化学と菌叢構造解析（ヒト糞便のエタノール代謝研究を例として）

# Gut microbiota analysis in microbial biochemistry

○中山 亨（東北大院工）
○Toru Nakayama (Tohoku Univ.)

【はじめに】次世代シーケンサーを用いるマイクロバイオーム解析は，医学，健康科学，微生物生態学，環境科学等の幅広い領域において，研究の進展に多大なインパクトを与えている．本講演では，ヒト腸内細菌のエタノール代謝に関連する微生物生化学研究において，マイクロバイオーム解析の結果をどのように活用できたかについての事例紹介を行いたい（1）．

【研究の背景】習慣的多量飲酒はいくつかの臓器の発がんリスクを増大させる．それらのメカニズムは一様ではないと考えられるが，飲酒習慣による上部消化管発がんのメカニズムについては，飲酒後，上部消化管内で滞留するアセトアルデヒド（AcH）が主たるリスク因子であることが確実視されている．動物実験では AcH に発がん性が認められており，その変異誘発最小濃度は 50 μM と見積もられている．こうしたことから，WHO の国際がん研究機関 IARC は 2010 年に，アルコール飲料および飲酒に関連する AcH はヒトに対して発がん性を示すと結論し，これを Group1 の発がん物質に分類した．

大腸発がんの罹患リスクにも習慣的飲酒量との間に明確な相関が認められる．例えば大腸鏡検査による腺腫や腫瘍（主に上皮内がん）の発見率は，習慣的な多量飲酒家であるアルコール依存症（アルコール使用障害）患者（ア症患者）においてそれぞれ 54%および 6%であり，これらの値は非患者における発見率より格段に高い．この飲酒関連の大腸発がんリスクの増大には，大腸内で生成する AcH が関わる可能性が推察され，また腸内細菌の関与も指摘されてきた（2）．実際に過去の研究において，健常者の腸内容物をエタノールとインキュベートすると変異誘発最小濃度を大きく上回る AcH が生成することが示されている．こうしたことからア症患者では，長期間にわたる多量飲酒によって大腸内にエタノール資化性微生物が集積され，糞便の AcH 生成活性が高まり，大腸粘膜が恒常的に AcH に暴露されることにより大腸発がんの罹患リスクを増大させている可能性が推定されてきた．

【研究の概要】この仮説の妥当性を検証するため，まず，ア症患者の糞便から数百株の腸内細菌を分離し，個々の分離株について系統解析とアルコール代謝解析を行うことにより，AcH 蓄積能の高い細菌種を同定した．一方，ア症患者と健常者の糞便の AcH 生成能を比較した．また同じ糞便サンプルについて 16S rRNA アンプリコン解析を実施し，患者と健常者の糞便の菌叢構造を比較し，その結果を上述の生化学データと比較照合した．

【文献】(1) Sci. Rep. 6:27923 DOI: 10.1038/srep27923 (2016)　(2) Nat. Rev. Cancer 7: 599–612 (2007).

microbiome, ethanol metabolism, alcoholism

講演番号：3CS01-6
講演日時、会場：3 月 19 日 11:30～ C16 会場

# 嗅覚研究にみる農(芸)化学と脳科学の融合

# Integration of agricultural chemistry and brain science in the olfactory research

○東原 和成（東大農）
○Kazushige Touhara (Univ. Tokyo)

昆虫から哺乳類まで、多くの生物にとって、匂いやフェロモンは、食べ物や敵味方や異性を判断する重要なシグナルである。一方、人間にとって、匂いや香りは、料理をおいしく食べ、季節の移ろいを感じるもととなるものであり、生活の QOL を大きく左右する。近年、分子生物学と神経科学の進展で、匂いやフェロモンを感知する仕組みは、分子、受容体、脳神経、内分泌、行動レベルで解明されつつある。2004 年度のノーベル医学生理学賞は嗅覚受容体遺伝子の発見に与えられた。また、嗅覚受容体は、2012 年度のノーベル化学賞の対象になった G タンパク質共役型受容体のファミリーに属する。嗅覚研究は、動物が食べ物を探して食べて生きて、そして異性と交尾して子孫を残すために必須な感覚機能を解明するという基礎「生命科学」であるとともに、香りでより美味しく料理を食べて至福を味わい、生物間コミュニケーションに使われるフェロモンなどの信号を利用してよりよい環境を目指すという、まさしく「生命」「食」「環境」の農芸化学の三本柱に密接に関わるものである。本講演では、匂いやフェロモン分子が受容体で認識されてから、その信号が脳に伝わって情報処理されて感覚となり行動や情動が生じるまでの一連の流れにそって、現在、知られている知見を概説する。農芸化学分野のお家芸でもある「ものとり」で単離構造決定したフェロモン研究も紹介する。そして、食品、香粧品、製薬、化学工学など産業界への、嗅覚研究の応用展望についてもふれたい。参考文献: (1)「化学受容の科学」（東原和成編、化学同人、2012）, (2)特集「匂い・フェロモン・味の不思議—分子レベルから行動まで一」現代化学 2014 年 9 月号, (3)特集「化学感覚と脳」実験医学 2014 年 11 月号, (4)特集「嗅覚の脳神経科学の最前線」医学のあゆみ 2015 年 5 号, (5)特集「嗅覚のシグナル・受容体・脳に関する最新知見」におい・かおり環境学会誌 2015 年 7 月号

odorant, pheromone, olfactory

発表責任者：東原和成（ktouhara@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

# ランチョンシンポジウムプログラム

本大会でのランチョンシンポジウムのチケットは，京都女子大学 B 校舎 2 階出入り口ロビーで開催日当日，8：15 より配布します．チケット配布の際，大会参加証にチケット受領の押印をしますので，大会参加登録をお済ませの上，チケットを受け取り，開始 5 分前までに会場にお越しください．空席がある場合は，チケットがなくても入場できます．

## 2LS01　JABEE ランチョンシンポジウム「農芸化学における技術者教育，技術士養成」

3 月 18 日（土）12:30〜13:30　C11 会場（C 校舎　3 階　301）
世話人：江坂宗春（広大院生），金沢和樹（吉備国際大地域創成農）
座　長：榊原陽一（宮崎大農），東田英毅（㈱ちとせ研究所，東工大 ACLS）

12:30　2LS01–1　**農芸化学と JABEE，そして技術者教育** ……○江坂宗春（広島大生物圏科学）
12:40　2LS01–2　**機能性食品開発技術士を目指して**……○金沢和樹（吉備国際大学地域創成農学部）
13:00　2LS01–3　**学生に技術士補試験を勧めるわけ**……○浅野行蔵（旭川食産支援セ）
13:20　**閉会の挨拶** ……野尻秀昭（東大生物生産工学研究セ）

## 2LS02　男女共同参画ランチョンシンポジウム（グループフォーラム）「仕事をする女性研究者・技術者をとりまく“あれこれ”」

後　援：男女共同参画学協会連絡会
3 月 18 日（土）12:30〜13:30　K36 会場（K 校舎　1 階　カフェテリア）

12:30　**開会の挨拶** ……辻　智子（㈱吉野家ホールディングス）
12:40　2LS02–1　**研究室生活を快適に送るための環境づくり**……○飯嶋益巳（大阪大学産業科学研究所）
私が研究室生活を送るなかで日常的に感じる，女性の目線から見た問題点やその対処法についてお話しします．

2LS02–2　**企業における研究開発** ……○小野佳子（サントリーウエルネス㈱）
アカデミアと企業における研究の違い，企業だからこそ味わえる喜びについて共有できればと思います．

2LS02–3　**大学で得た困難と喜び** ……○井上奈穂（山形大学農学部）
「研究者」「大学教員」として遭遇した数々の困難と喜びについて，女性ならではの視点も交えながらお話しします．

2LS02–4　**菓子メーカーで活躍する女性技術開発者たち**……○河本政人（森永製菓㈱研究所）
菓子開発現場で私が感じてきた，女性ならではと思える技術開発の経験談についてお話しさせていただきます．

2LS02–5　**大学の研究室生活におけるちょっとした違和感**
……○佐藤ちひろ（名古屋大学生物機能開発利用研究センター）
大学での教育・研究・運営に携わる中で感じるいくつかの違和感に対する葛藤は解決するのか？ ということについてお話しします．

2LS02–6　**企業研究者になったきっかけと現在の研究開発について**……○小林（袴田）夕香（㈱ J-オイルミルズ）
私が企業で研究をするようになった経緯，現在，二人の子育てをしながら働いている現状を紹介したいと思います．

2LS02–7　**女性が仕事を継続できる環境について**……○鈴木義人（茨城大学農学部）
女性が出産・育児を経て仕事を続けられる職場や家庭の環境について，今考えている事（昔は余り考えなかった！）をお話しします．

2LS02–8　**ネットワークづくりの重要性**……○夏目みどり（㈱明治 食機能科学研究所）
仕事を長く楽しく続けるために社内や専門家と，また働く親として地域で，それぞれのネットワークづくりについて語りましょう．

2LS02–9　**ラボ内あるある男女間ディスコミュニケーション**……○吉永直子（京都大学大学院農学研究科）
男女間，という括りは精確ではないですが，会話様式の違いで生じるストレスをどう防ぐか，一緒に考えてみたいと思います．

2LS02–10　**企業における女性技術者の役割と育成について**……○宮井真千子（森永製菓㈱）
私が女性技術者としてキャリアを重ねる中で経験したことを踏まえて女性特有の課題とその対応についてお話させて頂きます．

13:25　**閉会の挨拶** ……辻　智子（㈱吉野家ホールディングス）

上記の 10 のグループに分かれて，フリートークを行います．

講演番号：2LS01-1
講演日時、会場：3 月 18 日 12:30～ C11 会場

# 農芸化学と JABEE、そして技術者教育

# Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, JABEE and Engineering Education

○江坂 宗春 (広島大生物圏科学)
○Muneharu Esaka (Hiroshima Univ.)

日本技術者教育認定機構 JABEE（Japan Accreditation Board for Engineering Education）は、国際的に通用する技術者の育成のための技術者教育の振興、大学や高専の技術者教育プログラムの審査・認定を行う一般社団法人である（http://www.jabee.org を参照)。これまでの新規認定プログラムの累計は、173 教育機関の 494 プログラムになり、認定プログラムの修了生の累計は、約 24 万人に達した。

JABEE 認定・審査分野は 16 分野あるが、農芸化学会は「農学一般関連分野」に所属し、農学系 17 学会が加盟する農学会技術者教育推進委員会のもとで、「生物工学および生物工学関連分野」とも連携しながら、審査、普及、指導等を行っている。

これまでに、「農学一般関連分野」で 13 プログラム、「生物工学および生物工学関連分野」でも 6 プログラムが認定されている。

日本農芸化学会では、JABEE 対応委員会で、JABEE 対応の活動を行うとともに、全国大会時に、以下のような JABEE・教育シンポジウムを開催してきている。

- 2007 年度　「日本農芸化学会と JABEE」
- 2008 年度　「農芸化学における魅力ある大学教育と JABEE」
- 2009 年度　「農芸化学分野の大学院における技術者、研究者養成教育の改革」
- 2010 年度　「農芸化学における教育改革と分野別質保証」
- 2011 年度　「JABEE とキャリア教育」（東日本大震災で中止）
- 2012 年度　「農芸化学における人材育成」
- 2013 年度　「大学・大学院での教育改革と人材養成」
- 2014 年度　「農学系人材養成に関する最近の取り組みについて」
- 2015 年度　「グローバル人材育成と教育改革」
- 2016 年度　「技術者・研究者人生における技術士資格の意義とメリット」

JABEE 認定のメリットとして、「JABEE 修了生は、技術士の第一次試験が免除され、登録を行えば、すぐに技術士補となれる」。しかし、農芸化学・生物工学分野において、技術士資格の意義とメリットが十分理解されていない。今回、「農芸化学における技術者教育、技術士養成」と題したシンポとし、農芸化学会・生物工学分野における技術者教育・技術士養成に焦点をあてるとともに、JABEE 対応委員会の今後のあり方についても議論したい。

JABEE, Engineering education, Professional engineer

発表責任者：江坂宗春（mesaka@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：2LS01-2
講演日時、会場：3 月 18 日 12:40～ C11 会場

# 機能性食品開発技術士を目指して

# Aiming at consulting engineers for functional food development

○金沢 和樹（吉備国際大学地域創成農学部）
○Kazuki Kanazawa (Kibi International Univ. School of Agriculture Regional Vitalization)

「機能性食品開発技術士」という課題をいただいたが、このような分野はない。新規にできればヒットするかもしれない。しかし、この分野で成功するのは難しいと思う。目的食品の機能性をヒトで証明すればよい、というものではないからである。食品である限り、品質を保証し、消費期限を設定し、生産コストを調整し、継続生産を構築しなければならない。また、成分規格、残留農薬、申請登録など、食品に関わるあらゆる法規の基準をクリアーしなければならない。規格基準は専門の企業さんに任せればよいという訳にもいかない。規格基準をクリアーするための調製法を適用すると、機能性が失われることが多い。コストを市販に耐えるように絞れば、成分が壊れるなどのトラブルも起こる。したがって、その機能性成分の発掘に関わった研究者が、最終製品になるまでリーダーシップをとって開発しなければならない。これは数年単位の仕事である。そして、儲かるか否かは、疑問である。ここでは、以下の 4 つの開発例をあげる。それらが、開発に成功か、あるいは失敗に終わったかは、講演を聞いてご判断いただきたい。

一つは冷蔵庫である。野菜などの青物は、加工するよりも、機能性成分を維持しながら鮮度を保って食卓に供するのが好ましい。そこで、野菜室に 1 日に 1 J/cm$^2$ の UV 光を 5 分間 照射する LED を設置した冷蔵を 2004 年に特願した。これで野菜を 3 日間保蔵すると、フラボノイド合成の遺伝子が発現し、フラボノイドを増産しはじめた。例えば青いイチゴを 6 日間冷蔵庫に入れておくと、ペラルゴニジンを増産して真赤に熟した。冷蔵庫は市販しているが、LED は安価なので開発者の儲にはならなかった。二つ目は蜜蜂プロポリスのアルテピリン C である。民間薬でもあるが、顕著な抗炎症効果があり、バイオアベイラビリティも高かった。頻発性ポリプの患者さんで介入試験をすると、機能性を示す傾向が認められた。しかし、弱い副作用が検出された。三つ目は昆布のカロテノイドのフコキサンチンと食物繊維フコイダンの利用である。昆布からこれらを抽出し、酸化に敏感なフコキサンチンをフコイダンで抱接した粉末を調製した。しかし抽出のコストパーフォーマンスが悪く、市販に耐えなかった。タマネギ外皮はケルセチンという機能性成分を、植物界で最も豊富に含む。しかし産廃である。これを機能性素材として利用するために、残留農薬を基準値以下にするのに時間を費やした。そして安全を期して化粧品として開発した。製品は市販されているが、タマネギ外皮はあまりにも豊富にケルセチンを含むので、素材費が安価過ぎて、開発者の収入は少ない。

これらの話から、「機能性食品開発技術士」が新設できるか？のご意見がいただきたい。

JABEE, functional food, consulting engineer

発表責任者：金沢和樹（kazuki@kiui.ac.jp）

講演番号：2LS01-3
講演日時、会場：3 月 18 日 13:00～ C11 会場

# 学生に技術士補試験を勧めるわけ

# Why recommend students to do a professional engineer exam

○浅野 行蔵（旭川食産支援セ）
○Kozo Asano (Asahikawa Food Ind. Supp. Cent.)

JABEE コース卒業生は「技術士一次試験の免除」が JABEE の売りの一つです。でも、技術士ってどんな資格なのでしょうか。また二次試験とは、どんなものなのでしょうか。一次試験が免除なら JBEE コース終了後、ただちに二次試験を受けられるのでしょうか。

一次試験合格者が、二次試験を受けるにもさらなる資格が必要です。二次試験の受験資格を得る方法として技術士補登録して指導技術士の指導の下、あるいは優秀な技術者の指導の下で 4 年間の「実務経験」を積むことなどが要件で、「実務」経験が不可欠です。二次試験では、資格試験のような知識を問う部分と受験者自身の「実務の質」を問う試験となっており合格率 12%の試験です。

技術士となってメリットは何かとしばしば話題になります。技術士には 20 の技術部門があります。建設関連部門（建設、上下水道、環境、応用理学）では受験者も多く、資格の実利が明確です。業務を遂行する上で「技術士」の資格が必要な仕事が多いので、会社が社員に技術士取得を要請し待遇面でも優遇しています。一方、当学会員と関連する分野である生物工学、農業、水産、衛生工学などでは、業務独占的資格として扱われておらず知名度が低いのが現状です。

各部門では頻繁に勉強会や交流会が開かれています。技術士はむろん技術士補になれば、勉強会に参加でき技術分野の知識を増やせます。同じ部門の違う業種の技術士とも交流を通じて独自の人脈の構築ができます。学会よりも頻度が高いく分野も広いので裾野の広い人脈ができます。

似かよった分野の技術士ですから会社ではそれぞれの業務の先端部門を担っており多数の機密技術にも関わっています。相手の守秘義務を尊重し自分の守秘義務も守る倫理観を学んで行くとともに、技術の競争、切磋琢磨を経験します。交流を通じて会社による社風の違いや戦略の違いを現在進行形で知ることができ世界観が変わってきます。これらの体験を学生にもしてほしいと私は学生に技術士という資格を紹介してきました。

技術士の分野で上位に位置づけられる総合技術監理部門は、リスク管理の考え方と進め方を実践する分野で、どの技術士にも必要な考え方です。技術士は、Professional Engineer として国際基準の技術者であり、海外業務が多くなっている会社でも自分の位置づけを示せます。技術者の流動化は進んでおり技術士は　エンジニアとしての公認資格として有効となるでしょう。

professional engineer, JABEE, education

発表責任者：浅野行蔵（asanok@chem.agr.hokudai.ac.jp）

# ランチョンセミナー　プログラム

本大会のランチョンセミナーのチケットは，セミナー開催当日の京都女子大学 B 校舎 2 階出入口ロビーにて配布します．配布時間は，3 月 18 日が 8:15〜10:15，3 月 19 日が 8:30〜10:30 です．

チケット配布の際，大会参加証にチケット受領の押印をしますので，大会参加登録をお済ませの上，チケットをお受け取り下さい．

チケット配布は，定員に達した時点で終了します．

チケットは，12:30 を過ぎると無効になります．その後はチケットをお持ちでない方と同等の扱いとなりますのでご注意ください．チケットをお持ちでない方は，ランチョンセミナーに参加できません．ただし，空席がある場合はこの限りではありません．

## 3 月 18 日(土) 12:30〜13:20

### LS 2-1　日東薬品工業株式会社　　B10 会場（B 校舎 5 階 517）

座長：小川　順（京都大学大学院農学研究科）

内なる生態系からのメッセージ　〜腸内細菌のチカラ〜

木村 郁夫（東京農工大学大学院農学研究院）
岸野 重信（京都大学大学院農学研究科）

### LS 2-2　ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社　　C14 会場（C 校舎 3 階 308）

座長：加藤 久典（東京大学総括プロジェクト機構）

遺伝子改変マウス骨格筋代謝産物の網羅的解析

亀井 康富（京都府立大学生命環境科学研究科）

### LS 2-3　サントリーウエルネス株式会社　　C18 会場（C 校舎 4 階 401）

座長：柴田 浩志（サントリーウエルネス株式会社 健康科学研究所）

**1.** 腸管バリア機能と健康のつながり

鈴木 卓弥（広島大学大学院生物圏科学研究科）

**2.** **S-PT84 株の NASH に対する予防効果**

有江 秀行（サントリーウエルネス株式会社 健康科学研究所）

### LS 2-4　株式会社林原　　C23 会場（C 校舎 5 階 502）

司会：三鼓 仁志（株式会社林原 研究開発本部 食品開発部）

腸内フローラを介した健康効果　―新しい水溶性食物繊維「イソマルトデキストリン」の可能性－

**1.** 腸内フローラの重要性とそれを介した健康効果

西村 直道（静岡大学学術院農学領域）

**2.** 新しい水溶性食物繊維「イソマルトデキストリン」の生理機能

渡邊　光（株式会社林原 研究開発本部 食品開発部 ファイバリクサ開発課）

### LS 2-5　株式会社島津製作所　　C25 会場（C 校舎 5 階 504）

司会：奥村　毅（株式会社 島津製作所）

島津製作所の最新質量分析ソリューションのご紹介

**1.** 血中に移行した食事由来ペプチドの同定と定量
―プリカーサースキャンをつかったペプチドの特異的検出―

佐藤 健司（京都大学大学院農学研究科）

**2.** ① **LC/MS/MS メソッドパッケージ D, L アミノ酸を用いた発酵食品中の D, L アミノ酸一斉分析例のご紹介**
② **LC/MS/MS メソッドパッケージ細胞培養プロファイリングを用いた培地成分の簡易定量法のご紹介**

渡邉　淳（株式会社島津製作所 分析計測事業部）
豊田 健一（株式会社島津製作所 分析計測事業部）

## 3 月 19 日(日) 12:30〜13:20

### LS 3-1　株式会社 明治　　A05 会場（A 校舎 4 階 401）

座長：永尾 雅哉（京都大学大学院生命科学研究科）

健康な肌づくりを目指して　〜乳由来スフィンゴミエリンが持つ皮膚バリア機能改善の可能性〜

菅原 達也（京都大学大学院農学研究科）

### LS 3-2　味の素株式会社　　B10 会場（B 校舎 5 階 517）

身体活動・身体不活動を科学する　〜よりよい健康づくりのために〜

宮下 政司（早稲田大学スポーツ科学学術院）

### LS 3-3　東ソー株式会社　　C11 会場（C 校舎 3 階 301）

たんぱく質精製効率化のポイント　〜基礎技術から最新情報までのご紹介〜

神近 俊人（東ソー株式会社バイオサイエンス事業部）

### LS 3-4　日本ウォーターズ株式会社　　C14 会場（C 校舎 3 階 308）

天然カロテノイドの構造，分布，代謝とその役割に関する研究　〜質量分析・SFE および SFC 技術の活用〜

眞岡 孝至（一般財団法人 生産開発科学研究所 食物機能研究室）

### LS 3-5　バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社　　C18 会場（C 校舎 4 階 401）

免疫沈降と蛍光ウェスタンブロッティングの最新アプリケーション

1. 免疫沈降のコツと有用なツールの紹介

中田 宣之（バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社）

2. 新しい定量蛍光ウェスタンブロッティング

西村　諭（バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社）

### LS 3-6　サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社　　C23 会場（C 校舎 5 階 502）

液体クロマトグラフィーを用いた既知・未知天然物の分析ワークフロー
〜効率的な分離メソッド開発・見逃しのない検出・質量分析計を用いた構造予測〜

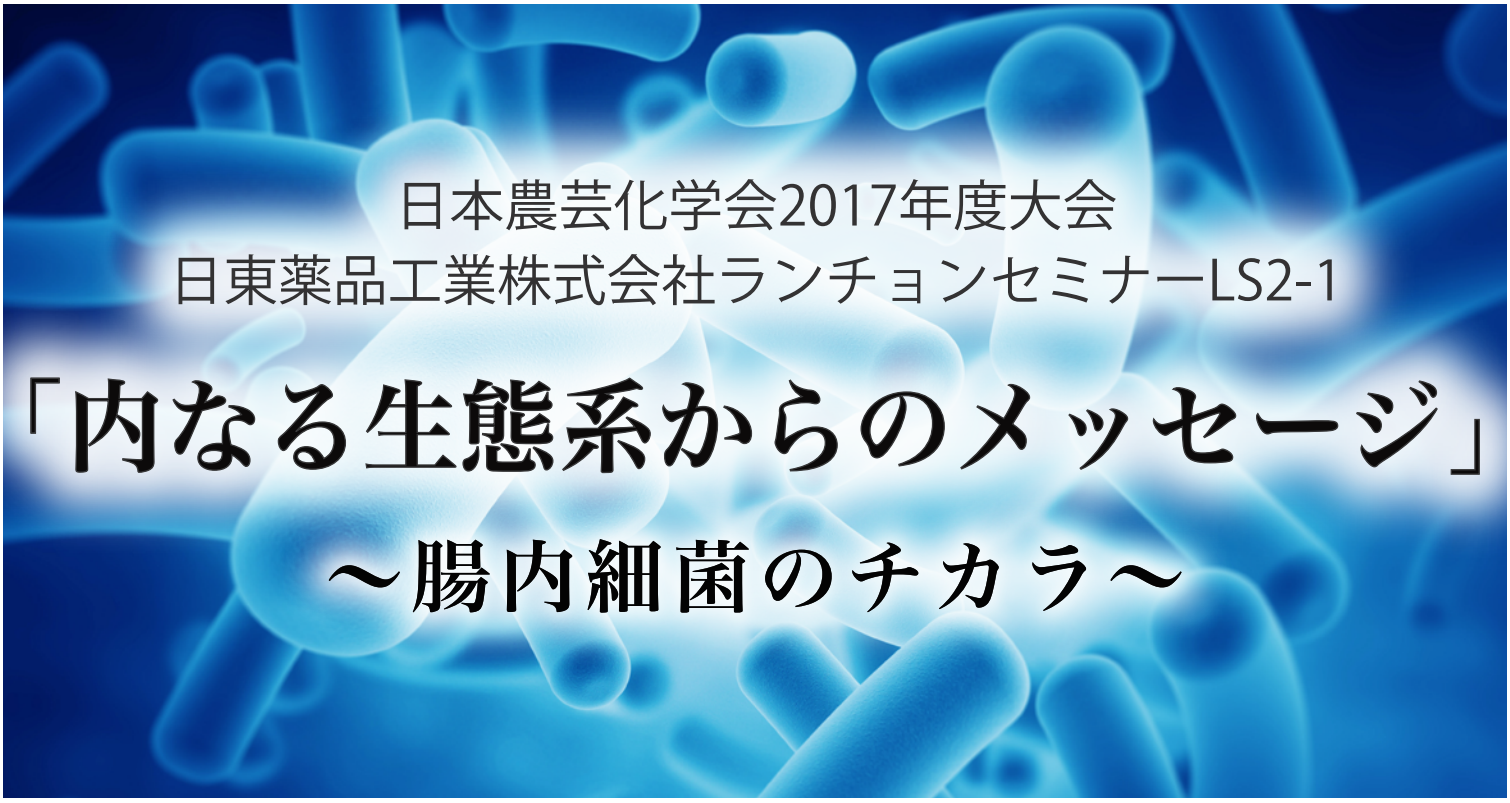
高原 健太郎（サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社）

### LS 3-7　タカラバイオ株式会社　　C25 会場（C 校舎 5 階 504）

司会：栗田 豊久（タカラバイオ株式会社 営業部）

クローニングから精製まで
タンパク質解析実験を強力にサポートするツールのご紹介

井上 晃一（タカラバイオ株式会社 営業部）



日本農芸化学会2017年度大会
日東薬品工業株式会社ランチョンセミナーLS2-1

# 「内なる生態系からのメッセージ」

## ～腸内細菌のチカラ～

座長 小川 順 先生
（京都大学大学院農学研究科 教授）

講師 木村 郁夫 先生
（東京農工大学大学院農学研究院 准教授）

講師 岸野 重信 先生
（京都大学大学院農学研究科 助教）

日時
2017年3月18日(土)
12:30～13:20

会場
B-10

スケール感は違っても、次の二つの文章が描く関係性には共通点があるように思えます。
・人の活動は、環境に対して様々な影響を与えています。今、環境を健やかな状態に維持するべく、人間活動と環境の調和を、生態学的観点から探る取り組みがなされています。
・腸内細菌の活動は、人に対して様々な影響を与えています。今、人を健やかな状態に維持するべく、腸内細菌活動と人の調和を、生態学的観点から探る取り組みがなされています。
人は生態系を構成する要素であると同時に、自身にも内なる生態系を抱えています。
本セミナーでは、内なる生態系からのメッセージとも言える、腸内細菌の代謝物に焦点を当てた研究例、また、代謝産物の応用例を紹介し、健やかな腸内細菌・人・環境に思いを馳せてみたいと思います。みなさんの頭の中に、生態系マトリョーシカが浮かびあがるかも・・・。

日東薬品工業株式会社
医薬品・乳酸菌原料の製造販売

HMT Human Metabolome Technologies

日本農芸化学会 2017 年度大会 LS2-2

# ランチョンセミナー

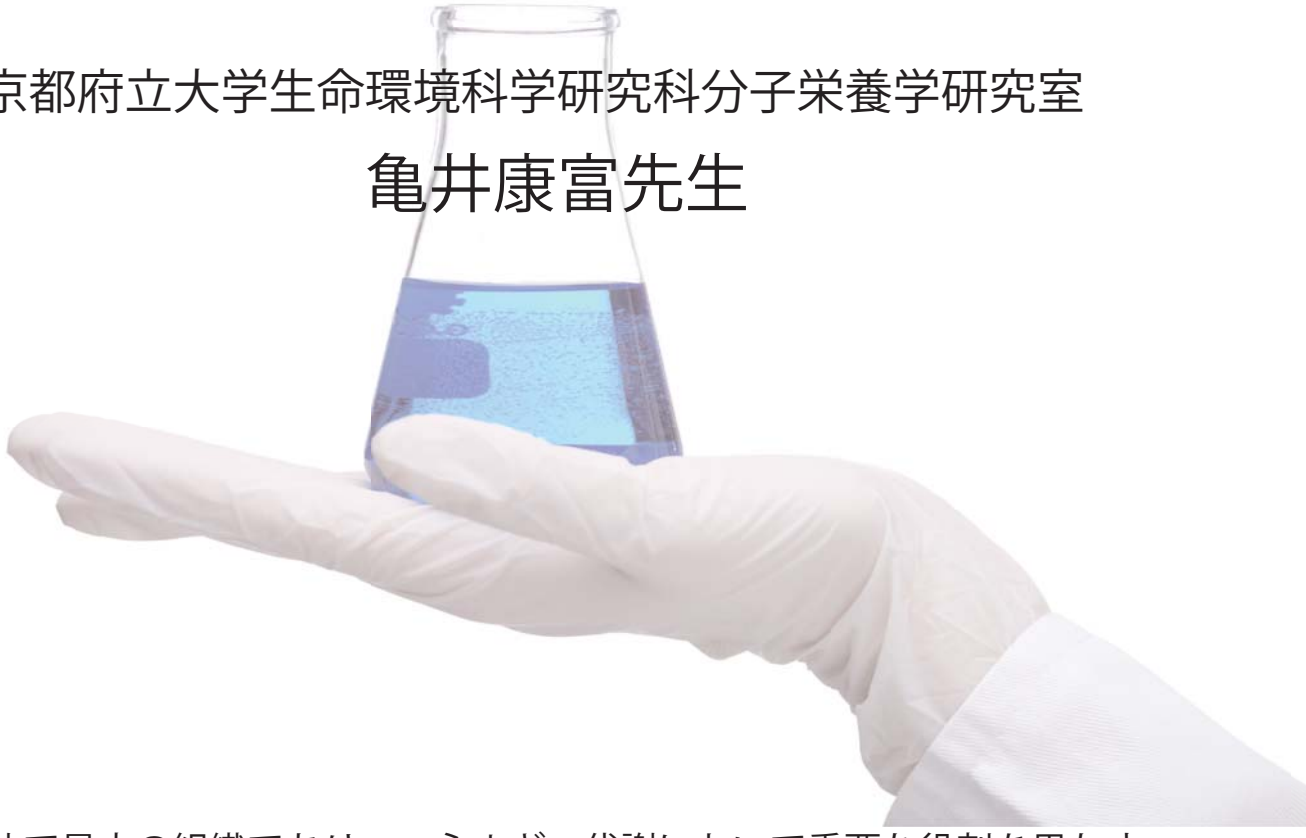
## 日時　3 月 18 日（土）12：30 ～ 13：20

## 会場　C-14（京都女子大学）

# 遺伝子改変マウス骨格筋代謝産物の網羅的解析

京都府立大学生命環境科学研究科分子栄養学研究室

亀井康富先生



骨格筋は人体で最大の組織であり、エネルギー代謝において重要な役割を果たす。適度な運動により、肥満や生活習慣病が予防・改善されることはよく知られている。運動した時に骨格筋で生じる遺伝子発現や代謝変動を調べることは筋機能改善のための機能性食品や医薬品開発の手がかりになるだろう。本演題ではマウス骨格筋におけるメタボローム解析について紹介する。

ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社　詳細はお問い合わせください

contacthmt@humanmetabolome.com ☎ 03-3551-2180 http://humanmetabolome.com

日本農芸化学会2017年度大会

# ランチョンセミナー LS2-3

## サントリーウエルネス株式会社

【日時】3月18日(土) 12:30-13:20

【会場】C-18会場(C校舎4階401)

【演題1】

## 腸管バリア機能と健康のつながり

**鈴木　卓弥**（広島大学　大学院生物圏科学研究科　教授）

近年、生体防御機能の一種である「腸管バリア機能」が着目されるようになってきた。健康な腸では、腸管内の有害な物質や細菌、ウイルスなどが生体内部に侵入して害を与えないように、腸上皮細胞を起点とした腸管バリア機能が存在する。しかしながら、加齢、ストレス、食の乱れといった要因によってその腸管バリア機能が減弱、あるいは消失することで、有害因子が生体内に侵入することが知られている。有害因子は、腸はもちろん血流を介して全身の様々な組織に傷害を与え、慢性疾患を誘発し、生活習慣病、不安やうつ、サルコペニアなどを増悪させると言われている。従って、腸管バリア機能を維持・強化することは健康において極めて重要と考えられる。本セミナーでは、腸管バリア機能と健康の関わりについて紹介する。

【演題2】

## S-PT84株のNASHに対する予防効果

**有江　秀行**（サントリーウエルネス株式会社　健康科学研究所）

サントリーウエルネス社が保有する乳酸菌*Lactobacillus pentosus* S-PT84株は、全身の免疫を賦活化する乳酸菌として選抜された。最近の研究の結果から、生活習慣病の1つであるNASHのモデルにおいて、NASHの進展を抑制するだけではなく、腸管バリア機能に対して保護的に作用することが明らかとなってきた。腸管バリアの中でも、タイトジャンクションへの作用が想定されており、傷害により緩んだタイトジャンクションを正常に戻し、腸から体内への有害因子の侵入を妨げていると考えている。本セミナーでは、S-PT84株の最新の研究成果を紹介する。

【座長】

**柴田　浩志**（サントリーウエルネス株式会社 健康科学研究所長）

Suntory Wellness

# 日本農芸化学会 2017 年度大会
# LS2-4　株式会社林原　ランチョンセミナー

**日時**　2017 年 3 月 18 日（土）　12:30 ～ 13:20

**場所**　京都女子大学　C 校舎　5F C-23 会場（C-502）
（京都市東山区今熊野北日吉町 35）

# 腸内フローラを介した健康効果

## ー新しい水溶性食物繊維「イソマルトデキストリン」の可能性ー

### ●講師

静岡大学　学術院農学領域　教授

**西村 直道 先生**

**「腸内フローラの重要性とそれを介した健康効果」**

近年、 腸内フローラ研究の発展は目覚ましく、 腸内細菌およびその代謝産物の重要性が明らかになってきている。 本講演では、 最新の腸内細菌研究をまじえて、 腸内細菌およびその代謝産物の重要性を明らかにするとともに、 それら代謝物が宿主に与える健康効果について論じる。 その中で難消化性糖質（特に水溶性食物繊維）の果たす役割についても紹介する。 さらに、 新しい水溶性食物繊維「イソマルトデキストリン」の可能性について、 最新の研究成果をまじえて紹介する。

### ●講師

株式会社林原　研究開発本部　食品開発部　ファイバリクサ開発課　課長

**渡邊 光**

**「新しい水溶性食物繊維『イソマルトデキストリン』の生理機能」**

腸内環境を良好に保つためには、食物繊維の摂取が有効であることが知られている。しかし、我が国では食事の欧米化に伴い摂取量が慢性的に不足している。 新しい水溶性食物繊維「イソマルトデキストリン」は、様々な食品に配合しやすい食物繊維素材である。 本講演では、イソマルトデキストリンの生理機能を中心に「腸から健康に！」に関わる最新のトピックスを紹介する。

### ●司会

株式会社林原　研究開発本部　食品開発部　部長

**三鼓 仁志**

**◆試食品◆**
イソマルトデキストリン配合のシリアルバーをご用意しています

HAYASHIBARA NAGASE Group　株式会社 林 原　http://www.food.hayashibara.co.jp/

SHIMADZU
Excellence in Science

日本農芸化学会2017年度大会

# ランチョンセミナーのご案内

## LS2-5　島津製作所の最新質量分析ソリューションのご紹介

日時　2017年3月18日（土）12:30～13:20

会場　C-25会場（京都女子大学C-504教室）

講演1　**血中に移行した食事由来ペプチドの同定と定量**
**-プリカーサースキャンをつかったペプチドの特異的検出-**

演者　佐藤 健司 先生　（京都大学大学院農学研究科　応用生物科学専攻　教授）

ESI-トリプル四重極型液体クロマトグラフ質量分析計は、低分子化合物の定量分析に汎用されている。一方、本装置はミリマスを得ることが困難であり構造解析には不向きであるとされている。しかし、MS/MSにより生じる特定のプロダクトイオンを生じるプリカーサーイオンを検出することが可能である。そのため誘導化試薬由来のプロダクトイオンを生成するプリカーサーイオンを検出することで誘導化試薬に反応する化合物のみを検出することが可能である。この手法を用い、ペプチドを複雑なマトリックスから検出し、さらにプロダクトイオンのパターンから構造を推定することが可能である。このアプローチの応用例を紹介する。

講演2　**①LC/MS/MSメソッドパッケージ D,L-アミノ酸を用いた発酵食品中のD,Lアミノ酸一斉分析例のご紹介**
**②LC/MS/MSメソッドパッケージ 細胞培養プロファイリングを用いた培地成分の簡易定量法のご紹介**

演者　渡邉　淳　（株式会社 島津製作所　分析計測事業部）
豊田 健一　（株式会社 島津製作所　分析計測事業部）

島津製作所では2010年トリプル四重極型質量分析計をリリースして以降、これまで多くの高速・高感度分析のツールを提供してきました。今回は、食品中のD,Lアミノ酸分析、培地の成分分析に関連する２つのアプリケーションを紹介します。

司会：奥村　毅　（株式会社 島津製作所）

お問合せ
（株）島津製作所　分析計測事業部　グローバルマーケティング部
〒604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町１　TEL：075-823-1352

日本農芸化学会2017年度大会

明日をもっとおいしく
meiji

LS3-1 株式会社 明治

## ランチョンセミナー

# 健康な肌づくりを目指して
## ～乳由来スフィンゴミエリンが持つ皮膚バリア機能改善の可能性～

**日時▶3月19日（日）12:30~13:20**

**会場▶A-05（京都女子大学A-401）**



**演者**

京都大学大学院 農学研究科
応用生物科学専攻
海洋生物生産利用学分野 教授
**菅原 達也** 先生

**座長**

京都大学大学院 生命科学研究科
統合生命科学専攻
生体情報応答学分野 教授
**永尾 雅哉** 先生

皮膚は、体の表面を覆う人体最大の臓器ともいえ、体内からの水分蒸散や、体外からの異物の侵入を防ぐための重要なバリア機能を担っています。加齢による老化に加えて、太陽光に含まれる紫外線、冬季における空気の乾燥、洗剤を用いた過度の皮膚の洗浄などの外的要因によっても、皮膚バリア機能の低下が起こり得ます。その結果、外からの異物が皮膚内部に入りやすくなると、肌荒れ、乾燥肌、敏感肌などの肌トラブルや、皮膚炎などの発症につながると考えられます。

食品成分を摂取することによって皮膚バリア機能が改善されることが報告され、なかでもセラミド関連食品素材（スフィンゴ脂質）に注目が集まっています。しかし、消化・吸収や作用メカニズムには不明な点も多いため、私たちはそれらの解明を目指した研究を進めています。ミルクはセラミド関連成分（スフィンゴミエリン）が多く含まれている食品です。この乳由来スフィンゴミエリンにも、皮膚バリア機能を改善して健康な肌を維持する効果が期待されます。

**本セミナーでは、乳由来スフィンゴミエリンの
構造、消化吸収性、皮膚バリアに対する機能性について、
私たちが進めてきた研究の成果をご紹介したいと思います。**

日本農芸化学会2017年度大会　ランチョンセミナー LS 3-2

amino VITAL アミノバイタル

# 身体活動・身体不活動を科学する

## ～よりよい健康づくりのために～



演者

**宮下 政司先生**

早稲田大学
スポーツ科学学術院
准教授

習慣的な身体活動（運動・スポーツと生活活動の両方を含む）が代謝性疾患の予防や改善に有効的であると広く認知されてきた一方で、わが国における身体活動の実施率の低さ（約30%）が指摘されている。また、身体不活動は全世界の死亡者数に対する4番目の危険因子としてされており、生活習慣病の流行や国民の健康と強く関連していると勧告されている（WHO, 2010）。長期的な健康支援策を考えた場合、形式的な運動の実践を推奨していくと同時に生活の中で活動量を高め、スクリーン時間等の座りがちな生活を軽減することを推奨していくことが重要である。

本セミナーでは、代謝性疾患の予防や改善のための身体活動の実践において、取り組み易さの観点で重要な要素となる身体活動の時間や頻度に焦点をあて、身体活動の時間や頻度が食後の糖・脂質代謝に及ぼす影響について検討した研究結果について紹介する。また、2020年東京オリンピック・パラリンピックの開催を前にスポーツへの関心が高まっている。日本人の食事摂取量が年々低下する中、強度が高くなり時間も長くなるような身体活動を継続していく際、体づくりの源となるタンパク質の摂取も重要になってくる。本セミナーではスポーツ愛好家等に対するタンパク質摂取の必要性についても紹介したい。

日時　2017年3月19日（日）
12:30～13:20

会場　B-10会場
（京都女子大学B-517）
席数：270席

Eat Well, Live Well.
AJINOMOTO

共催：味の素株式会社

日本農芸化学会 2017 年度大会

# 東ソー ランチョンセミナー

プログラム No. **LS3-3**

TOYOPEARL TSKgel

演題

## たんぱく質精製効率化のポイント

### ～基礎技術から最新情報までのご紹介～

日時

**3月19日（日）**

**12:30 - 13:20**

会場

**C-11会場**

**（京都女子大学 C校舎 3F C-301）**

演者

**神近 俊人**（東ソー株式会社バイオサイエンス事業部）

たんぱく質の精製において、液体クロマトグラフィーは、適用範囲の広さや処理能力の高さから広く使用されています。現在、多くのクロマトグラフィー用充填剤が市販されていますが、最適なモードの組み合わせ、グレードの選択、条件設定等を行うことにより、精製効率を格段に向上させることが可能です。本セミナーでは、中速液体クロマトグラフィー用充填剤TOYOPEARLを用いたたんぱく質精製の基礎、及び応用について、イオン交換モードを中心に、ノウハウを交えて紹介いたします。

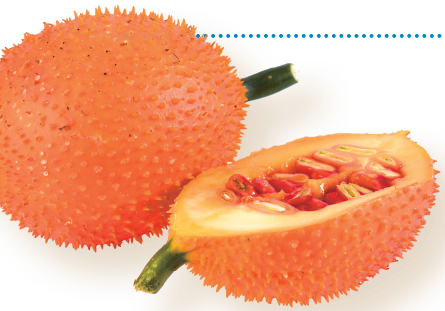
また、これまでのイオン交換モードの弱点の一つであった高塩濃度サンプルへの適用を可能とした充填剤や、複数のモードを組み合わせたミックスモード充填剤等、最新の技術についても紹介いたします。

TOSOH
東ソー株式会社
バイオサイエンス事業部

本 社／〒105-8623 東京都港区芝3-8-2 芝公園ファーストビル
TEL 03-5427-5180 FAX 03-5427-5220
大 阪 支 店 ☎（06）6209-1948 名古屋支店 ☎（052）211-5730
福 岡 支 店 ☎（092）781-0481 仙 台 支 店 ☎（022）266-2341
山口営業所 ☎（0834）63-9888
http://www.separations.asia.tosohbioscience.com/

［ 日本農芸化学会2017年度大会 ］
日本ウォーターズ株式会社 ランチョンセミナー

# 天然カロテノイドの構造、分布、代謝とその役割に関する研究
## ～質量分析・SFEおよびSFC技術の活用～



**3月19日（日）12:30～13:20**

**会場: C-14（京都女子大学 C校舎 3F C-308）**

**プログラム番号 LS3-4**


## 眞岡 孝至 様 ［ 一般財団法人 生産開発科学研究所 食物機能研究室 ］


カロテノイドは光合成生物が生産する物質量の0.1%を占めるといわれその生産量は年間約1億トンと考えられている。二次代謝産物としては天然に最も広く分布する化合物の一つであり、果実、果皮、種子などの非光合成器官には様々な構造のカロテノイドが存在する。

微生物と植物はカロテノイドを酢酸やメバロン酸などから生合成することができるが、動物は体内でカロテノイドを生合成することはできない。このため動物の体内に存在するカロテノイドはすべて食物から摂取されたものに由来している。動物は食物から吸収したカロテノイドを体内で酸化や還元、二重結合の転位など部分的に化学変換をすることができる。動物のカロテノイドは食物連鎖を経て蓄積され、さらに体内で代謝変換されるのでさまざまな構造の化合物が存在する。

海産動物の多くは表皮にカロテノイドを蓄積しており、表皮のカロテノイドは光酸化防止、保護色、婚姻色としての役割をはたしている。これらの動植物での機能研究から近年アスタキサンチンをはじめとするカロテノイドが優れた抗酸化活性を持つ事が明らかになりサプリメントとして用いられている。

これらのカロテノイドの機能を解明するには生体内のカロテノイドの精密で高感度の分析が必要である。今回はWaters ACQUITY LC Xevo G2-S Q Tof MSを用いて植物、動物やヒト体内の微量カロテノイド分析を行った結果得られたいくつかの知見について報告する。さらにカロテノイドは酸素に対して不安定であるため超臨界流体抽出と超臨界流体クロマトグラフィーによる分析についても検討したのでこれらについて述べる。



UPLC / XevoG2-XS QTof


**日本ウォーターズ株式会社** www.waters.com
東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川 1-3-12 第5小池ビル TEL 03-3471-7191（代表） FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島 5-14-10 新大阪トヨタビル 11F TEL 06-6304-8888（代表） FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
サービス拠点 東京 大阪 札幌 福島 静岡 富山 名古屋 徳島 福岡


Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

# 免疫沈降と蛍光ウェスタンブロッティングの最新アプリケーション

**日時：3 月 19 日（日）　12:30 ～ 13:20**
**場所：C-18 会場（京都女子大学）**

**演題① 免疫沈降のコツと有用なツールの紹介**（中田 宣之　バイオ・ラッド ラボラトリーズ）

**演題② 新しい定量蛍光ウェスタンブロッティング**（西村 諭　バイオ・ラッド ラボラトリーズ）

タンパク質の抽出・回収は、タンパク質分析を行う上で必須の作業であり、また分析結果に直結する非常に重要なステップです。
例えば、タンパク質の回収方法の１つである免疫沈降は回収条件によって再現性や回収効率に影響を与えます。また、使用する抗体（回収用、検出用）の選択によっても実験結果が変わる場合があります。
一方タンパク質検出法として一般的に用いられているウェスタンブロッティングでは、論文投稿時のデータとして特異性、感度、そして定量性が求められるようになってきています。また、ホースラディッシュパーオキシターゼ（HRP）と発光基質により非常に高感度の検出を行えますが、定量直線性やダイナミックレンジ、複数ターゲットの検出など、未だ問題となる場面が多くあり、正確なデータを求める際には多くの点で注意が必要な方法でもあります。

本ランチョンセミナーでは、免疫沈降と、蛍光を用いたウェスタンブロッティングに焦点を当て、実験 Tips や新しいツールをアプリケーションデータとともに紹介し、実験をより確実に行うための新しい提案をいたします。

セミナーでは以下の内容を予定しています。

◆免疫沈降：
- 様々な Tips と実験のノウハウ
- 免疫沈降用抗体
- 有用な実験ツール

◆ウェスタンブロッティング
- 新しい蛍光色素を用いた蛍光ウェスタンブロッティング
- 総タンパク質を用いたデータ補正
- 蛍光ウェスタンブロッティングによる複数ターゲットのマルチプレックス検出と解析



バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社
ライフサイエンス　http://www.bio-rad.com

Z11067L 1703a

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社　ランチョンセミナー LS3-6

日時：3 月 19 日（日）12：30〜13：20／会場：C-23 会場（京都女子大学 C-502）

**液体クロマトグラフィーを用いた既知・未知天然物の分析ワークフロー**
**〜効率的な分離メソッド開発・見逃しのない検出・質量分析計を用いた構造予測〜**

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社
クロマトグラフィー&MS 事業部　マーケティング部
高原　健太郎

広いラインナップの分析装置を提供しているサーモフィッシャーならではの、特徴的な分析システムを実用例とともにご提案します。

**— LC メソッド検討の効率化：Thermo Scientific AppsLab Library（https://appslab.thermoscientific.com/）**

研究者が測定すべき化合物は多種多様であり、既存の情報を利用した効率のよい分離メソッドの最適化が望まれます。当社ではさまざまな装置（GC、LC、IC、GCMS、LCMS）の分析条件が登録された無料のウェブサイト“AppsLab Library”を提供しており、当社のクロマトグラフィー解析ソフトウェアを用いれば、ダウンロードした分析条件を最少 6 クリックで測定可能です。一方、適当な分析メソッドがヒットしない場合は、労力少なく分析法を検討できるメソッドスカウティングが有用です。

**— 見逃しの回避：荷電化粒子検出器による不揮発性化合物のユニバーサルな検出**

測定対象が UV 吸収を持つとは限りません。荷電化粒子検出器は UV 吸収を持たない、あるいは弱い化合物の検出に活用できます。加えて分子種に関わらず、重量依存の一貫した応答性を示すため、標準物質がなくても相対定量が可能です。装置原理と具体的な天然物測定例を紹介します。

**— MS による構造情報の取得：mzCloud（https://www.mzCloud.org/）**

効率的な解析のためには、クロマトグラムで得られたピーク成分の化学構造情報をオンラインで取得できることが望ましく、検出器として MS の活用が期待されます。構造解析には、多段階 MS 解析が可能なイオントラップ MS が適しており、部分構造の情報を示すマススペクトルを取得できます。当社では、MS/MS スペクトルを集積した無料のウェブサイト“mzCloud ライブラリ”を提供しており、マススペクトルのマッチングから部分構造推定が可能です。また、分子組成式を正確に決定するには、精密質量が観測できる Thermo Scientific Orbitrap 質量分析計が適しています。

本セミナーでは、天然物を分析する研究者の要望に応じて、どのような分析システムを採用あるいは導入すべきかについてご提案します。

# 日本農芸化学会2017年度

LS3-7

演　題：

# クローニングから精製まで

## タンパク質解析実験を強力にサポートするツールのご紹介

演　者：井上　晃一
タカラバイオ株式会社　営業部

日 時　3月19日(日) 12:30-13:20

**会場：C-25**（京都女子大学　C校舎 5F C-504）

---

タカラバイオでは、目的遺伝子のクローニングからタンパク質発現、精製まで、タンパク質の解析実験をトータルでサポートする独自技術を有する関連製品を幅広く取り揃えています。
クローニングでは制限酵素不要のクローニングキット『In-Fusion』を、タンパク質発現では生産効率と可溶性発現の向上が期待できるコールドショック発現系『pColdベクター』を、また、ヒト細胞で一過性に目的タンパク質を高生産可能な『pHEK293 Ultra Expression Vector』などを取り揃えています。
Hisタグ融合タンパク質の精製には、独自開発した次世代メンブレン技術を持つ『Capturem His-Tagged Purification Kit』が威力を発揮します。本キットは、Bed volumeが小さく、洗浄バッファーの残存がない高純度精製が可能であり、室温、最速5分で精製が完了します。
また、EDTA、還元剤、グリセロールなどの添加剤を含む条件下でも使用することが可能です。
さらに、この次世代メンブレン技術とProtein Aの抗体結合能を組み合わせた製品『Capturem Protein Aシリーズ』により、抗体のアフィニティ精製を簡便・迅速に行うことが可能です。
また、Capturem Protein Aシリーズを使うことにより、免疫沈降（IP）や共免疫沈降（Co-IP）も簡便・迅速に実施することが可能です。
本セミナーでは、タカラバイオが提供するタンパク質実験を強力にサポートするユニークな関連製品についてデータを交えてご紹介します。

タカラバイオ株式会社

東京支店　TEL 03-3271-8553　FAX 03-3271-7282
関西支店　TEL 077-565-6969　FAX 077-565-6995
テクニカルサポートライン
TEL 077-565-6999　FAX 077-565-6995
Website　http://www.takara-bio.co.jp
Facebook　http://www.facebook.com/takarabio.jp

that's GOOD science!™

Clontech TaKaRa cellartis

本書の内容の一部または全部を無断で複写複製（コピー）及び転載することは、法律で認められた場合を除き、権利の侵害となりますので、あらかじめ本会あて許諾を求めてください。
Copyright © 2017 by Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry

日 本 農 芸 化 学 会　2017 年 度 大 会 講 演 要 旨 集　（オンライン）
Proceedings (online) of the Annual Meeting 2017 Kyoto of Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry
2017 年 3 月 5 日公開　　Published online 5 March 2017　　ISSN 2186-7976

発行者　　公益社団法人日本農芸化学会　　JSBBA　　http://www.jsbba.or.jp/
PUBLISHER　113-0032 東京都文京区弥生 2-4-16 学会センタービル 2 階　　Phone 03-3811-8789

データ作成者 株式会社ダイナコム　　DYNACOM　　http://www.dynacom.co.jp/
ASSISTS　　261-7125 千葉県千葉市美浜区中瀬 2-6-1WBG マリブイースト 25 階　　Phone 043-213-8131
小宮山印刷工業株式会社　　COMOIYAMA PRINTING　　http://www.kopas.co.jp/
162-0808 東京都新宿区天神町 78　　Phone 03-3260-5211